

# Validação de Métodos para Análise de Alimentos

*Enfoque em Análise Centesimal*



# VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS: ENFOQUE EM ANÁLISE CENTESIMAL

Comitê Técnico de Química de Alimentos da REMESP

## **Coordenação:**

Gilberto Batista de Souza

Merenice Roberto Sobrinho

Yolanda Boza

1ª edição

**Coordenação Editorial:** Rede Metrológica do Estado de São Paulo - REMESP  
**Concepção e Desenvolvimento:** Comitê Técnico de Química de Alimentos da REMESP  
**Coordenação:** Gilberto Batista de Souza | Merenice Roberto Sobrinho | Yolanda Boza  
**Revisão Técnico-Científica:** Igor Renato B. Olivares | Vitor Hugo Polisé Paccès  
**Revisão ortográfica do texto e correção gramatical:** Profa. Dra. Iris Gardino  
**Diagramação:** Patricia Rejane Citrângulo  
**Projeto gráfico:** Rafael Moraes  
**Imagem da capa:** <http://dreamstime.com>

**Equipe técnica do projeto:**

Ana Lucia de Matheus e Silva (ITAL)  
Carla Ivone Carraro (BRF)  
Elaine Marra de Azevedo Mazon (IAL)  
Elza Teresinha Grael Marasca (ITAL)  
Gilberto Batista de Souza (Embrapa Pecuária Sudeste)  
Igor Renato B. Olivares (IQSC/USP)  
Márcia Regina Cucatti Alves (ITAL)  
Mary Ângela Fávoro Perez (ITAL)  
Merenice Roberto Sobrinho (SENAI)  
Valquíria T. D'Almeida (Microbial Laboratory)  
Vera Sonia Nunes da Silva (ITAL)  
Vitor Hugo Polisé Paccès (IQSC / USP)  
Yolanda Boza (IAC)

**Apoio:**

BRF  
Embrapa Pecuária Sudeste (EMBRAPA)  
Instituto Adolfo Lutz (IAL)  
Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC/USP)  
Instituto Agrônômico (IAC)  
Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)  
Microbial Laboratory;  
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI)

FICHA CATALOGRÁFICA

Validação de métodos para análise de alimentos: enfoque em análise centesimal / editores, Gilberto Batista de Souza, Merenice Roberto Sobrinho, Yolanda Boza; Ana Lucia de Matheus e Silva ... [et al.] – 1. ed. – São Paulo : REMESP, 2016.

123 p. : il. ; 23 cm.

ISBN 978-85-69725-00-8

1. Validação de métodos. 2. Alimentos. 3. Química analítica. 4. Manuais de laboratório. 5. Metrologia química. I. Silva, Ana Lucia de Matheus. II. Carraro, Carla Ivone. III. Mazon, Elaine M. de Azevedo. IV. Marasca, Elza T. Grael. V. Souza, Gilberto Batista. VI. Olivares, Igor Renato B. VII. Alvez, Márcia R. Cucatti. VIII. Perez, Mary Ângela F. IX. Sobrinho, Merenice Roberto. X. D'Almeida, Valquíria T. XI. Silva, Vera Sônia Nunes. XII. Paccès, Vitor Hugo Polisé. XIII. Boza, Yolanda. V. Título.

# APRESENTAÇÃO

A composição da matéria-prima, a presença de aditivos, as características da embalagem bem como as condições de processamento, estocagem e de distribuição são determinantes da “qualidade de um produto alimentício”, a qual é definida por suas características físicas, químicas e microbiológicas. Uma fração desses requisitos/características é fixada e regulamentada, constituindo os padrões de identidade e qualidade do produto alimentício e requisito para sua comercialização.

Na indústria alimentícia, a conformidade e a confiabilidade de produtos e processos fazem-se por meio do controle eficiente em todos os estágios do processo de produção, da matéria-prima até o produto a ser consumido. A eficácia do controle da qualidade de produtos e processos é avaliada por meio de resultados oriundos de análises físicas, químicas e microbiológicas; logo, a qualidade desses resultados passa pela qualidade de seus laboratórios de ensaio, tornando-se imprescindível que esses laboratórios demonstrem a capacidade de prover resultados com garantia de qualidade analítica. A validação de seus métodos analíticos é um dos requisitos para um laboratório demonstrar a qualidade de seus resultados analíticos, bem como promover a melhoria contínua da qualidade de suas medições analíticas, concomitantemente a de seus produtos e processos e, portanto, aumento da competitividade mercadológica de seus produtos.

O livro “Validação de Métodos para Análise de Alimentos: Enfoque em Análise Centesimal” é fruto do esforço conjunto da equipe de especialistas do Comitê Técnico de Química de Alimentos da Rede Metrológica do Estado de São Paulo.

É um Guia prático para ser utilizado na bancada dos laboratórios onde se desenvolvem atividades analíticas, cujo conteúdo facilitará a atividade profissional dos laboratórios químicos e certamente contribuirá para a melhoria dos resultados apresentados.

Parabenizo todos àqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a elaboração deste manual, com a certeza de que ele promoverá ganhos de qualidade para o setor agropecuário e para a indústria do País.

*Dr. Celso Scaranello  
Presidente da REMESP*



# PREFÁCIO

Os avanços no melhoramento genético de vegetais e animais, as mudanças de hábitos da população, a contínua introdução de novos produtos alimentícios no mercado – resultantes do desenvolvimento de novos ingredientes, produtos e processos bem como de importação - são fatores que, associados aos crescentes estudos clínico-nutricionais, sobre as propriedades dos constituintes alimentares, promovem frequentes revisões e alterações na Legislação e, concomitante, demandam novos métodos analíticos ou pela adequação desses. Em virtude disso, os laboratórios necessariamente precisarão validar esses novos métodos para que sejam empregados com exatidão e precisão adequadas, na avaliação dos parâmetros nutricionais desses novos ingredientes e produtos alimentícios.

Ainda nesse contexto, em virtude da expressiva participação do Brasil no mercado mundial de *commodities* agropecuárias, há uma crescente demanda no País pelo desenvolvimento de processos produtivos desses em consonância com normas e procedimentos harmonizados e/ou aceitos como padrões internacionais, a fim de propiciar condições para superar possíveis barreiras não tarifárias, atender a requisitos técnicos específicos e/ou resultar em diferencial competitivo.

Para o setor de alimentos, a adequada quantificação dos constituintes de ingredientes e de produtos alimentícios é requisito para não apenas garantir a qualidade e o atendimento dos respectivos padrões de identidade e qualidade do produto, bem como adequar as condições processamento, acondicionamento, transporte e distribuição. Contudo essa quantificação torna-se complexa em decorrência da diversificação de matrizes alimentícias e das frequentes revisões e alterações na Legislação nacional e internacional. Assim, o uso da validação de métodos é uma importante ferramenta e um dos requisitos para os laboratórios químicos de alimentos produzirem resultados correspondentes às necessidades e características de um problema analítico e/ou matriz alimentícia.

Nesse contexto, este livro pretende ser um auxiliar na validação de métodos analíticos, uma vez que não há um procedimento único que possa ser seguido universalmente em validação e, em decorrência da grande diversidade de matriz alimentícia, torna-se impossível reunir exemplos de validação para todos os tipos e grupos de alimentos. Cabe ainda mencionar que o analista

encontra vários problemas analíticos durante a validação, incluindo a dificuldade de manutenção de padrões, o grau de perecibilidade da matriz, o grande número de matrizes e ainda as variabilidades sazonais das matrizes decorrentes de matérias-primas vegetal e animal.

Assim, o Comitê Técnico de Química de Alimentos (CTQA) da Rede Metro-lógica do Estado de São Paulo (REMESP) apresenta neste livro informações básicas, teóricas e de natureza prática de validação de métodos, com o objetivo de orientar o analista de alimentos a planejar e a interpretar procedimentos de validação.

# AUTORES

**Ana Lucia de Matheus e Silva** – Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista (UNESP-BOTUCATU). Especialista em Gerenciamento Ambiental e Sustentabilidade pela ESALQ/USP. Especialista em Saúde Pública pelo CRBio 01. Atualmente é Assistente Técnico de Pesquisa Científica do Instituto de Tecnologia de Alimentos, no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, com atuação nos seguintes temas: minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio), contaminantes inorgânicos (arsênio, cádmio, chumbo, mercúrio), espectrometria de emissão atômica, ICP OES e validação de métodos.

**Carla Ivone Carraro** - Graduação em Química Industrial e *lato sensu* em Química (Faculdades Oswaldo Cruz), mestrado em Tecnologia de Alimentos (UNICAMP) e doutoranda em Tecnologia de Alimentos com pesquisas na linha de saudabilidade em produtos cárneos (UNICAMP). Membro dos comitês de química da REMESP e do *Codex Alimentarius* no GT de métodos analíticos e amostragem. Coordenadora da Subcomissão de métodos analíticos do SINDIRAÇÕES. Experiência na área de Química Analítica em laboratórios de Garantia e Controle de Qualidade: Sistemas de Gestão da Qualidade, ISO/IEC 17025, BPL, Validação, Cálculo de Incerteza, Cromatografia e ensaios bromatológicos. Atua nos temas: nutrição animal e humana, saudabilidade e alimentos. Especialista de laboratório físico-químico na BRF S.A.

**Elaine Marra de Azevedo Mazon** - Graduada em Farmácia-Bioquímica pela Universidade Federal de Alfenas. Especialização em Saúde Pública pela Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Doutorado em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. Pesquisadora Científica e Diretora Técnica do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas do Instituto Adolfo Lutz no Centro de Laboratório Regional de Campinas. Atua principalmente nos seguintes temas: espectrometria atômica (FAAS e GF AAS), análises físico-químicas de alimentos, legislação e rotulagem.

**Elza T. Grael Marasca** – Farmacêutica Industrial. Mestre e Doutora em Microbiologia e Ciências (USP). Atua como Pesquisador Científico do Instituto de Tecnologia de Alimentos da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio da SAA. Tem experiência nas áreas de Biotecnologia (Biologia Molecular e processos fermentativos), Microbiologia de Alimentos (com ênfase em fisiologia e ecologia de bactérias lácticas), Segurança Alimentar e Gestão da Qualidade (NBR/ISO/IEC 9001-2015). Coordena o Time de Metrologia e preside a Comissão Interna de Biossegurança do ITAL. É membro do Comitê de Química de Alimentos da REMESP.



**Gilberto Batista de Souza** – Graduado em Química pela Universidade Estadual de Londrina, mestrado e doutorado em Química Analítica pela USP, analista A e supervisor do setor de laboratórios da Embrapa Pecuária Sudeste. Coordenador dos Ensaios de Proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal da ABINPET. Membro dos comitês de Química da REMESP; Métodos Analíticos do SINDIRAÇÕES; GT em Metodologia de Fertilizantes do MAPA; Rede de Metrologia Química do Inmetro; Comitê Gestor do Encontro Nacional sobre Metodologias e Gestão de Laboratórios da Embrapa. Com experiência na área de Química, atua nos temas: nutrição animal, alimentos e metrologia química.

**Igor Renato B. Olivares** – Doutor em Ciências (Química Analítica) pela Universidade de São Paulo (USP - 2006), Mestre em Ambiente e Saneamento pela Universidade de Campinas (UNICAMP - 2003), graduado em Química pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUCCAMP - 1999). Atualmente trabalha como professor em tempo parcial no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo - IQSC/USP (leciona disciplinas na área de Gestão da Qualidade e Ambiental, inclusive Estimativa de Incerteza, ISO/IEC 17025:2005, ISO 14001:2004 entre outras). Na área de Gestão de Qualidade, também atua em consultorias, treinamentos e publicação de trabalhos (com destaque para o livro: “Gestão de Qualidade em Laboratórios” com lançamento de sua 3.ª edição em janeiro de 2015 – [www.qualilab.net](http://www.qualilab.net)) e faz parte do quadro de avaliadores externos do INMETRO para a avaliação de Laboratórios. Tem experiência na área de Química, com ênfase em Cromatografia e Técnicas de Preparo de Amostras. Atua principalmente nos seguintes temas: sistemas de gestão da qualidade, ISO/IEC 17025, BPL, validação, cálculo de incerteza, cromatografia, técnicas de preparo de amostras.

**Márcia Regina Cucatti Alves** - Engenharia de Alimentos. Experiência na área de Análises Físico-Químicas e Instrumental de carnes e produtos cárneos e sistema da qualidade. Assistente de Pesquisa do Instituto de Tecnologia de Alimentos.

**Mary Ângela Fávaro Perez** - Bacharel em Química pela UNICAMP. Mestre em Química pela UNICAMP. Experiência na área de Química, com ênfase em Química dos Produtos Naturais e Migração Específica de Compostos Orgânicos em embalagens para alimentos.

**Merenice Roberto Sobrinho** – Doutorado em Ciência de Alimentos – FEA/UNICAMP. Graduação em Ciência dos Alimentos ESALQ/USP. Experiência em Vitivinicultura, Análise Instrumental de Alimentos e Bebidas e Sistemas de Gestão da Qualidade, NBR/ISO/IEC 17025. Membro do Comitê de Química de Alimentos da REMESP. Coordena o Laboratório de Ensaios em Bebidas do SENAI “Prof. Dr Euryclides de Jesus Zerbini”.

**Valquíria T. D’Almeida** - Bacharel em Química pela USP. Atua na área de Ensaios Físico-Químicos e Instrumentais de alimentos e bebidas - *Microbial Laboratory*.

**Vera Sônia Nunes da Silva** - Doutora em Alimentos e Nutrição e Mestre em Ciência da Nutrição Aplicada à Tecnologia de Alimentos pela Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP e Graduada em Química pela Universidade Metodista de Piracicaba. Pesquisadora contratada do Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL. Experiência na área de Análise de Alimentos, Ciência e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em Química e Bioquímica de alimentos, hidrólise enzimática, fibras alimentares, análise de aminoácidos e no desenvolvimento tecnológico de processos, visando ao reaproveitamento de coprodutos da agroindústria, para a obtenção de ingredientes nutritivos e funcionais.

**Vitor Hugo Polisé Paccès** - Docente e Pesquisador da Universidade de São Paulo onde ministra as disciplinas de ênfase em Sistemas de Gestão da Qualidade. Bacharelado em Química pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas (1996), possui mestrado e doutorado em Ciências (Química Analítica) pela Universidade de São Paulo (2005). É Diretor Executivo da Fundação de Apoio à Física e à Química, onde atua na coordenação de projetos de pesquisa e desenvolvimento com os setores públicos e privados. Desenvolve projetos com o CNPq e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2008-2015) para auditoria, implantação e aprimoramento de processos gerenciais e de gestão baseados na ISO/IEC 17025 e no aprimoramento das validações de métodos dos Laboratórios Nacionais Agropecuários de São Paulo (LANAGRO/SP). É autor do livro “Guia Prático do seu Computador”. O principal elemento da sua linha de pesquisa é o desenvolvimento de ferramentas computacionais para sistemas de gestão da qualidade e química, possuindo *softwares* registrados no INPI nesses temas. Com experiência na área de Química, ênfase nos Sistemas de Gestão da Qualidade em Laboratórios, atua principalmente nos seguintes temas: BPL, ISO/IEC 17025, validação de métodos analíticos, criação, utilização e desenvolvimento de ferramentas para a química analítica e sistemas da qualidade, desenvolvimento de *software* e cromatografia.

**Yolanda Boza** – Bacharel em Química pela UNESP - Araraquara. Doutora em Ciências de Alimentos pela UNICAMP. Atualmente é Assistente Técnico de Pesquisa Científica do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Experiência nas áreas de Química Analítica Instrumental e de Bioquímica de Alimentos e de Plantas, com ênfase em metabolismo de plantas e de microrganismos, obtenção e caracterização de biopolímeros, bebidas destiladas e produtos lácteos.



# CONTEÚDO

APRESENTAÇÃO .....	3
PREFÁCIO .....	5
AUTORES .....	7

## CAPÍTULO 1

<b>VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>17</b>
1 Introdução.....	17
2 Quais métodos devem ser validados?.....	20
3 Quem deverá realizar a validação do método? .....	21
4 Quais parâmetros de validação são necessários?.....	21
5 Referências .....	22

## CAPÍTULO 2

<b>PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1 Introdução.....	23
2 Especificidade e seletividade .....	25
Especificidade .....	26
Seletividade .....	27
3 Faixa de trabalho, faixa linear e linearidade .....	27
4 Sensibilidade.....	31
5 Limite de detecção (LD) .....	32
6 Limite de quantificação (LQ) .....	33
7 Robustez .....	34
8 Exatidão e tendência (bias) .....	35
Alguns estimadores de tendência (erro sistemático) .....	36
Erro relativo (%) (INMETRO, 2011) .....	36
Índice z (z score) (THOMPSON et al., 2006; INMETRO, 2011) .....	37
Erro normalizado $E_n$ (THOMPSON et al., 2006; INMETRO, 2011) .....	37
9 Precisão.....	37
Conceituação e cálculo do limite da repetibilidade ( $r$ ) .....	38
Conceituação e cálculo do limite da reprodutibilidade ( $R$ ) .....	38
Precisão Intermediária .....	39
10 Referências .....	43

## CAPÍTULO 3

### APLICAÇÃO DE VALIDAÇÃO EM ANÁLISE CENTESIMAL DE ALIMENTOS ....45

1 Introdução.....	45
2 Referências .....	48

## CAPÍTULO 4

### PROTEÍNA.....49

1 Introdução.....	49
2 Método de Kjeldahl .....	50
2.1 Etapas do método de Kjeldahl .....	50
Informações importantes:.....	51
3 Determinação de proteína bruta em farinha de soja e mortadela .....	52
Proposta de procedimento analítico.....	52
4 Resultados e Discussão .....	53
4.1 Precisão quanto à Repetibilidade .....	53
Exemplos de aplicação do índice de repetibilidade (r) na rotina do laboratório....	54
4.2 Precisão quanto à Reprodutibilidade .....	55
Exemplos para aplicação do índice de reprodutibilidade (R) na rotina do laboratório: .....	56
4.3 Avaliação da exatidão do método .....	56
5 Controle dos parâmetros críticos da análise / fontes de erro.....	58
5.1 Controle na recuperação de nitrogênio na análise de proteína. ....	58
5.1.1 Amostra: Composição, Preparo e Massa da Amostra. ....	58
5.1.2 Controle analítico nas etapas da análise de nitrogênio Kjeldahl.....	59
5.1.3 Presença de substâncias não proteicas (nitrogenadas inorgânicas e orgânicas) .....	63
5.1.4 Fator de Conversão de Nitrogênio – Proteína .....	63
6 Considerações sobre análise de Kjeldahl em algumas matrizes de alimentos .....	64
Composição química das amostras .....	65
Estado físico das amostras .....	65
7 Conclusão .....	66
8 Referências .....	66

## CAPÍTULO 5

<b>Umidade.....</b>	<b>69</b>
1 Introdução.....	69
2 Métodos.....	70
2.1 Métodos por secagem .....	70
Secagem direta por estufa.....	70
Secagem por radiação infravermelha .....	70
Secagem em fornos de micro-ondas .....	70
Secagem em dessecador .....	71
2.2 Método por destilação.....	71
2.3 Método químico com o emprego do reagente de Karl Fischer.....	71
3 Determinação da umidade em farinha de soja e mortadela por secagem em estufa.....	71
Proposta de procedimento analítico.....	71
4 Resultados e Discussão .....	72
4.1 Precisão dos resultados.....	73
Precisão quanto à Repetibilidade.....	<b>73</b>
Precisão quanto à Reprodutibilidade .....	<b>74</b>
4.2 Exatidão dos Resultados .....	75
5 Controle dos parâmetros críticos da análise / fontes de erro .....	76
Considerações sobre o preparo de amostra e características de algumas matrizes de alimentos para análise de umidade .....	77
Preparo de amostra .....	77
Características de algumas matrizes de alimentos.....	78
6 Conclusão .....	79
7 Referências .....	79

## CAPÍTULO 6

<b>CINZAS .....</b>	<b>81</b>
1 Introdução.....	81
2 Métodos de determinação das cinzas .....	82
Cinzas Secas .....	82
Cinzas Úmidas.....	82
Cinzas Secas a Baixas Temperaturas .....	82
3 Determinação de cinzas em farinha de soja e mortadela .....	83
Proposta de procedimento analítico.....	83
4 Resultados e Discussão .....	83
4.1 Precisão: repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados .....	83

4.2 Exatidão dos Resultados .....	86
5 Controle dos parâmetros críticos da análise / fontes de erro .....	86
Analista.....	87
Manipulação da amostra e procedimentos durante as pesagens .....	87
Tempo e Temperatura de incineração.....	87
Pesagem .....	89
6 Conclusão .....	89
7 Referências .....	89

## **CAPÍTULO 7**

<b>GORDURA TOTAL.....</b>	<b>91</b>
1 Introdução.....	91
2 Método de Soxhlet .....	92
Proposta de procedimento analítico.....	93
3 Resultados e Discussão .....	93
3.1 Precisão: repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados .....	94
Repetibilidade dos resultados.....	94
Precisão quanto à reprodutibilidade dos resultados .....	95
3.2 Exatidão dos resultados .....	96
4 Controle dos parâmetros críticos da análise / fontes de erro .....	97
Analistas .....	97
Solventes, Equipamentos e Condições Ambientais.....	97
Características químicas e físicas da Amostra .....	97
Amostras sólidas .....	98
Características químicas da amostra .....	98
Método de Bligh-Dyer .....	99
Métodos de Soxhlet de Goldfish .....	99
Método de Gerber.....	99
Método Rose-Gottlieb e Mojonier .....	100
5 Conclusão .....	100
6 Referências .....	101

## **CAPÍTULO 8**

<b>FIBRA ALIMENTAR TOTAL.....</b>	<b>103</b>
1 Introdução.....	103
2 Análise de fibra alimentar total na farinha de soja .....	104
Proposta de procedimento analítico.....	104

3. Etapas do método de determinação do teor de fibra alimentar total (FAT) .....	105
Digestão enzimática sequencial .....	106
Extração, secagem e pesagem .....	106
Cálculo do teor de fibra alimentar total .....	107
Cálculo da FAT (g/100g).....	107
4 Resultados e Discussão .....	107
4.1 Precisão: repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados .....	108
4.2 Exatidão dos Resultados .....	109
5 Controle dos parâmetros críticos da análise / fontes de erro .....	110
Analistas .....	110
Características químicas e físicas da Amostra .....	110
Equipamentos.....	111
Reagentes .....	111
6 Conclusão .....	112
7 Referências .....	113
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>115</b>
Passo a passo .....	115
<b>Índice de Tabelas e Quadros .....</b>	<b>121</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>123</b>





# VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

*Ana Lucia de Matheus e Silva  
Carla Ivone Carraro  
Elaine M. de Azevedo Mazon  
Elza T. Graef Marasca  
Gilberto Batista de Souza  
Igor Renato B. Olivares  
Márcia R. Cucatti Alves  
Mary Ângela F. Perez  
Merenice Roberto Sobrinho  
Valquíria T. D’Almeida  
Vera Sônia Nunes da Silva  
Vitor Hugo Polisél Pacces  
Yolanda Boza*

## 1 Introdução

Amostras de alimentos submetidas a análises químicas são, em geral, provenientes das atividades agropecuárias, das indústrias, das cadeias de distribuição, dos supermercados e outros. Sempre que houver tomadas de decisões baseadas em resultados analíticos, deve-se ter alguma indicação da rastreabilidade metrológica e qualidade desses resultados analíticos, porque, baseados nas concentrações dos compostos presentes nestas amostras, tomam-se decisões para o desenvolvimento de novos produtos, verificam-se padrões de identidade e qualidade, estimam-se rendimentos de processamento e custos de produção entre outros.

Os laboratórios analíticos devem assegurar a seus clientes que são capazes de fornecer dados com a qualidade esperada. Essa qualidade pode ser obtida com a aplicação de algumas ferramentas, como as apresentadas pelo *Analytical Quality Assurance Cycle* (Figura 1.1) (Olivares, Antunes, 2012).

O AQAC é uma maneira prática de relacionar requisitos que podem ser usados para prover rastreabilidade e confiabilidade dos resultados. A relação entre esses requisitos pode ser entendida ao implantar-se um novo método de ensaio num laboratório. Inicialmente é necessário validar o método visando demonstrar que é adequado ao uso pretendido, destacando que durante esse processo será possível conhecer os pontos fortes e fracos do método avaliado. Mesmo que o método seja normalizado, sempre será necessário que se avalie algum parâmetro de validação para verificar se o laboratório consegue obter resultados adequados com o método normalizado em suas condições operacionais (funcionários, instalações e equipamentos). Para implantar um novo método de ensaio em rotina, é necessário aplicar o primeiro requisito do AQAC, a validação. Após a validação, o segundo passo leva à estimativa da incerteza de medição, lembrando-se de que, aplicando-se a abordagem *validation based*, é possível utilizar-se de alguns resultados da validação, como “entradas” no diagrama de Ishikawa para o cálculo de incerteza (por exemplo, o estudo de linearidade e repetibilidade). Dessa maneira, poderá ser determinado o nível de confiança que se tem no resultado, conhecendo o valor da incerteza (aplicando o segundo requisito do AQAC). Após avaliar-se o método (durante a validação) e obter-se o nível de confiança do resultado (conhecendo a incerteza), o terceiro e último passo do ciclo será a aplicação do controle de qualidade, que visa demonstrar durante cada batelada de ensaio que o método ainda pode proporcionar resultados confiáveis; em outras palavras, é um processo de validação constante. Considere que, para cada batelada de amostra, seja realizada a análise de uma amostra de concentração conhecida. Assim, é possível avaliar-se de imediato a exatidão e, em longo prazo, calcular-se a dispersão de uma série de resultados obtendo-se uma precisão intermediária. Produzindo-se novos dados de precisão intermediária (que é um parâmetro de validação), é possível recalcular a incerteza, e o AQAC acaba girando como um círculo sem fim. Destaca-se que, para dar sustentabilidade à aplicação desses requisitos, o ciclo é ligado por elos de uma corrente, indicados como “uso de equipamentos calibrados” e “uso de padrões certificados” necessários para a confiabilidade dos resultados obtidos (Olivares, 2015).

Entre os requisitos do AQAC, a validação é a primeira etapa do ciclo, mas existem outros controles de qualidade que podem ser aplicados, como o emprego de materiais de referência, procedimentos externos de controle de qualidade - como a participação em ensaios de proficiência - e, quando exigida, a acreditação de ensaios na NBR ISO/IEC 17025:2005 (EURACHEM, 1998).

É necessário não apenas garantir que as características de desempenho de um método sejam entendidas, mas também demonstrar que o método é cientificamente coerente sob as condições nas quais é usado. É necessário um conjunto de verificações de um método analítico, conhecido como validação.

Durante a validação de um método analítico, é possível verificar-se, por meio de experimentos laboratoriais devidamente conduzidos, se o método é adequado ao propósito pretendido (*fitness for purpose*), isto é, se o laboratório é capaz, com o emprego desse método, de produzir resultados correspondentes às necessidades e características do problema analítico. A validação verifica se, realmente, o método mede o que foi destinado a medir (por exemplo, proteína em farinha de soja), e se sua precisão é adequada.

Considerando que a validação é um processo de medição, antes de inicia-la os equipamentos utilizados devem estar funcionando adequadamente e devidamente calibrados. Também é fundamental que o analista que realiza os estudos de validação seja competente, treinado e tenha domínio da teoria e prática envolvidas no método ensaiado, de modo que seja capaz de tomar decisões adequadas com base nas observações.

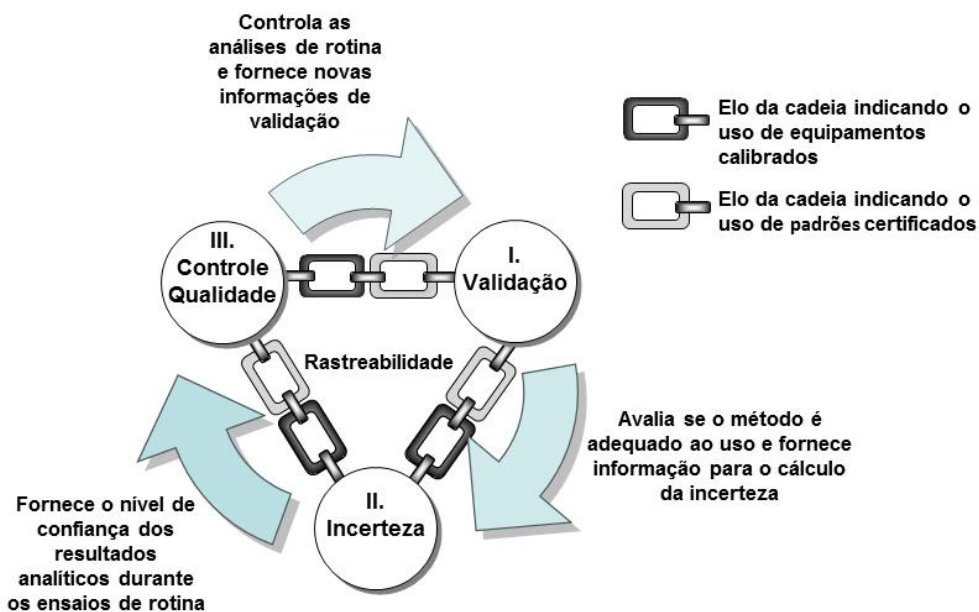


Figura 1.1. ....  
*Analytical Quality Assurance Cycle (AQAC) (Olivares, Antunes, 2012)*

## 2 Quais métodos devem ser validados?

Devem ser validados os métodos desenvolvidos para resolver problemas específicos; métodos modificados para solucionar um novo problema; método utilizado em uma matriz diferente da que foi realizada a validação inicial; um método na sua implantação; método cujos equipamentos foram substituídos; método cujo escopo foi alterado etc.

São comuns os casos de validação, comparando-se métodos, buscando-se demonstração de sua equivalência; por exemplo, comparando-se um método novo com um método-padrão ou oficial. Nesses casos, pode ser necessário que, além de estatísticas de provável equivalência, os métodos não apresentem diferenças estatísticas significativas nas estimativas de parâmetros de validação. Caso essas diferenças venham a ser significativas, num determinado nível de significância, o laboratório terá de fazer sua opção entre os métodos, de acordo com sua rotina.

Os métodos oficiais requerem avaliação de alguns parâmetros de validação

para se demonstrar que o laboratório os emprega com propriedade e seu ambiente mantém as condições necessárias para se obter boa qualidade em seus resultados. Os parâmetros de validação exigidos dependerão da natureza do método, das alterações publicadas em órgãos regulamentadores, das mudanças realizadas pelos laboratórios, dos equipamentos, condições em que o método vai ser usado, alteração de limites legais, condições dos laboratórios, custos estimados, entre outros.

A análise de alimentos apresenta dificuldades operacionais e analíticas. Entre eles, a perecibilidade das matrizes. Por isso a repetição de alguns procedimentos extensos de validação, ou mesmo a verificação completa de certos parâmetros, nem sempre é possível.

A aquisição, garantia da estabilidade e disponibilidade de materiais de referência certificados (MRC) compatíveis com as matrizes utilizadas nos laboratórios são problemas comuns em análises de alimentos. E, ainda, a variabilidade de composição nos alimentos causada pela sua heterogeneidade e formulação, incluindo pratos prontos ou semiprontos; produtos cárneos e lácteos ou produtos que os empregam em sua formulação, a variação de composição de matérias-primas produzidas em diferentes estações e /ou ano agrícola pode incluir variações imprevisíveis nas medições.

### 3 Quem deverá realizar a validação do método?

O laboratório que utiliza um método é responsável por garantir que seus resultados sejam válidos e tenham a precisão necessária. Em consonância com a NBR ISO/IEC 17025:2005 (**ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS**, 2005), o laboratório deve especificar a responsabilidade, a autoridade e o inter-relacionamento de todo o pessoal que gerencia, realiza ou verifica os trabalhos que influenciam na qualidade dos ensaios.

### 4 Quais parâmetros de validação são necessários?

Para os métodos publicados em normas internacionais, regionais ou nacionais, é preciso aplicar os parâmetros de validação de acordo com o tipo de ensaio para se verificar o desempenho do método. Essa aplicação é baseada no tipo de ensaio: qualitativo, quantitativo ou propriedades físicas (*LABORATORY OF GOVERNMENT CHEMISTS*, 2003). Parâmetros de validação costumam ser especificados em guias orientativos no âmbito de um setor em

particular; assim, recomenda-se que, quando estiverem disponíveis, sejam seguidos.

Baseado na Tabela 2.1 (Capítulo 2), o responsável deve aplicar os parâmetros de desempenho do método que devem ser validados. A avaliação criteriosa das características do analito e da matriz fornece uma boa base para planejar a validação.

Para os métodos não normalizados, aqueles desenvolvidos pelo próprio laboratório, adaptados de métodos normalizados, métodos publicados em revistas técnicas, de fabricantes de equipamentos, *kits* e métodos normalizados usados fora do escopo previsto. A validação, nestes casos deve atender as necessidades de uma determinada aplicação ou área de aplicação e ser abrangente, para se atender o uso pretendido do método.

## 5 Referências

**ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT), NBR ISO/IEC 17025:2005 - Requisitos Gerais para competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração** – outubro, 2005.

EURACHEM (A Focus for Analytical Chemistry in Europe). **The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. Teddington: LGC, 1998. 61 p.

LABORATORY of Government Chemists, LGC; **Valid Analytical Measurement, VAM. In-house method validation** - A guide for chemical laboratories. Teddington: LGC, 2003, 56 p.

OLIVARES, I.R.B.; LOPES, F.A. Essential steps to providing reliable results using the Analytical Quality Assurance Cycle. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 109-121, 2012.

OLIVARES, I. R. B. **Gestão de Qualidade em Laboratórios**. 3.ed., Campinas: Átomo, 2015. 160 p.

# PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

*Ana Lucia de Matheus e Silva  
Carla Ivone Carraro  
Elaine M. de Azevedo Mazon  
Elza T. Grael Marasca  
Gilberto Batista de Souza  
Igor Renato B. Olivares  
Márcia R. Cucatti Alves  
Mary Ângela F. Perez  
Merenice Roberto Sobrinho  
Valquíria T. D’Almeida  
Vera Sônia Nunes da Silva  
Vitor Hugo Polisél Pacces  
Yolanda Boza*

## 1 Introdução

Diante de um método analítico, o responsável pelo laboratório deve verificar qual (is) parâmetro(s) de validação deve(m) ser testado(s), quando e com que grau de intensidade poderá fazê-lo para poder concluir sobre o bom / mau desempenho na execução do método. Portanto a aplicação dos parâmetros de validação são atribuição e responsabilidade do técnico que o domina.

Os principais parâmetros de validação são: seletividade e especificidade (descrição do mensurando); faixa de trabalho, linearidade; sensibilidade, calibração; tendência (ou erro sistemático); limite de detecção; limite de quantificação; robustez; exatidão; precisão definidos neste texto.



O técnico responsável pelo método deve observar o tipo de resposta produzida pelo método (se qualitativa ou quantitativa); confirmar a identidade do analito (testar seletividade ou especificidade); obter os limites de detecção e quantificação; testar a recuperação, os níveis prováveis de concentração (% , g/100g, mg.kg<sup>-1</sup>, ng.kg<sup>-1</sup> entre outras unidades) quando julgar necessário. Outro aspecto que requer atenção especial é a unidade em que o resultado da medição é expresso e que deverá ser considerada em todos os parâmetros de validação.

Como característica obrigatória e necessária em sistemas de qualidade, o laboratório deve garantir a rastreabilidade de seus resultados para possibilitar sua verificação a qualquer tempo. Assim, deve codificar adequadamente os analitos de interesse, identificar matrizes usadas, padrões, fornecedores, reagentes, purezas, datas de validade, datas de realização de ensaio, identificação do analista, para garantir a rastreabilidade metrológica. Ao contratar a realização de determinada medição, o laboratório deve especificar para o cliente quais métodos de medição dispõem a precisão com que opera etc. e verificar se suas condições satisfazem as exigências desse cliente.

Os parâmetros necessários na validação costumam variar de acordo com o tipo de ensaio. A Tabela 2.1 traz algumas sugestões do que poderá, ou não, ser necessário em diversos tipos de métodos.

Antes de iniciar a validação de um método, o laboratório deverá validar dispositivos de cálculo e processos a serem usados, ou empregar dispositivos de cálculo e processos validados. Assim, se for usada uma calculadora, os cálculos dela provenientes terão de ser confirmados; o mesmo ocorrerá com *softwares* e planilhas. Uma forma de confirmar um *software* ou um cálculo de uma calculadora programável por meio de comparação com resultados obtidos de forma manual ou exemplos descritos em livros e demonstrar que os resultados coincidem.

**Tabela 2.1.**.....  
Parâmetros de validação comumente necessários conforme o tipo de ensaio.

PARÂMETROS	ENSAIO			
	Qualitativo	Determinação do componente (ou analito) de maior teor (1)	Análise de elementos menores e traços (2)	Propriedades físicas
Precisão		X	X	X
Seletividade	X	X	X	X
Tendência recuperação		X	X	X
Robustez	X	X	X	X
Sensibilidade linearidade / faixa de trabalho		X	X	X
Limite de detecção	X		X	
Limite de quantificação			X	

(1) Dependendo da faixa de concentração do analito, pode não ser necessária a determinação dos limites de detecção e de quantificação, como: determinação de sacarose em balas e do teor de gordura em carnes; componentes maiores com concentração entre 1% a 100%, desde que estejam estabelecidos como escopo de acreditação ou figurem entre as matrizes que o laboratório documentou como abrangidas pelo método.

(2) São considerados de menor teor concentrações aquelas entre 0,01% a 1% e elementos- traços, os elementos em concentração abaixo de 0,01%.

Fonte: LABORATORY OF GOVERNMENT CHEMISTS (2003)

## 2 Especificidade e seletividade

Uma amostra de alimentos, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se pretende quantificar. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Entretanto os vocábulos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações (INMETRO, 2011).

Na prática, diferentes testes de especificidade e seletividade referem-se ao mesmo problema: Medimos mesmo o que pensamos que estamos medindo?

Entender os diferentes mecanismos que causam interferências pode ajudar a seleção dos parâmetros e encontrar soluções para os problemas encontrados. Por exemplo, a medição pode ser alterada porque os reagentes, a matriz da amostra ou outros componentes alteram a sensibilidade do detector que mede o analito de interesse, ou porque esses compostos afetam diretamente a resposta. O efeito de erros sistemáticos (interferências) e erros proporcionais (um dos efeitos de matriz mais comuns) podem ocorrer ao mesmo tempo.

Uma vez conhecidos, esses problemas podem ser superados por meio de adição-padrão, análise de múltiplos componentes ou por uma mudança no pré-tratamento, separação, ou detecção. Se a seletividade não for assegurada, a validação estará seriamente comprometida.

## Especificidade

A verificação de especificidade necessita de uma pesquisa cuidadosa do conhecimento disponível na área de aplicação para que se encontrem todos os analitos a serem estudados. Assim, o analito, a matriz com ou sem analito, matérias-primas do processo, impurezas dos materiais iniciais ou do processo, subprodutos e produtos de degradação ou metabólitos e reagentes em branco devem todos ser analisados.

Problemas de especificidade frequentemente encontrados em técnicas mais comuns, como as de espectrofotometria de UV/Visível ou de cromatografia líquida, podem requerer comparações de resultados, variando as condições de medição e análise de pureza de sinal para verificar se algum outro componente conhecido ou desconhecido está sendo determinado com o analito. E, ainda, devem-se usar técnicas adicionais como: cromatografia de camada fina (CCF) ou espectroscopia de massa (EM), após a separação e recuperação do analito.

O uso dessas técnicas adicionais é particularmente necessário para avaliar estabilidade do analito. Nesse caso, as amostras utilizadas nos ensaios de condições extremas são estudadas cuidadosamente para provar que nenhum produto de degradação, conhecido ou desconhecido, possa perturbar o sinal do analito.

## Seletividade

Uma matriz a ser analisada pode ter componentes que interferem no desempenho da medição pelo detector selecionado, sem que seja registrado um sinal visível no teste de especificidade. Esses componentes, interferentes, podem ampliar ou reduzir o sinal; adicionalmente, a magnitude do efeito no sinal também pode depender da concentração que é medida.

Define-se seletividade como a capacidade de um método determinar acuradamente o analito de interesse na presença de outros componentes concomitantemente.

Experimentos para avaliação da seletividade, descritos na literatura, envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além de avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (Tabela 2.2). Quando não há disponibilidade de interferentes, alguns autores sugerem a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais (INMETRO, 2011).

**Tabela 2.2.**.....

Avaliação da seletividade.

Procedimento	Demonstrar	Comentários
Fazer a análise com a amostra e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos validados.	Habilidade do método identificar e medir o analito corretamente.	Verificar se há evidências para concluir sobre haver seletividade com confiabilidade suficiente.
Analisar amostras com vários interferentes suspeitos na presença do analito de interesse.	Verificar se a presença de interferente acentua ou inibe a detecção ou quantificação do analito de interesse.	Se resultados se alterarem, aperfeiçoar o método ou selecionar outro mais adequado.

Adaptado de: INMETRO (2011).

## 3 Faixa de trabalho, faixa linear e linearidade

Para o método analítico, há uma faixa de concentrações do analito na qual o método responde ao teor do analito e pode ser aplicado.

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação na qual o ensaio vai ser usado; nela costuma haver uma região de resposta aproximadamente linear em que a resposta do sinal demonstrará uma relação linear com o analito (ou valor da propriedade). A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho.

A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito nos quais foi demonstrada a possibilidade de medição com a precisão e exatidão exigidas nas condições especificadas para o ensaio. A Tabela 2.3 contempla os procedimentos a serem realizados para estabelecer a faixa de trabalho e a faixa linear.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e obtida a partir de uma regressão linear, estimada pelo método dos mínimos quadrados.

Os programas que estimam regressões lineares costumam apresentar os valores estimados de  $a$  e  $b$ , resíduos e alguns coeficientes como o coeficiente de correlação linear ( $r$ ). Este é frequentemente utilizado para indicar o quanto a reta estimada pode ser considerada adequada às medições, e comumente se requer que os coeficientes de correlação, em módulo, sejam maiores que 0,90 ou 90% (ou conforme critérios pré-estabelecidos pelo laboratório ou alguma instrução normativa) nos trabalhos de validação. O método pode ser considerado como livre de tendências (erros sistemáticos) se a estimativa de  $a$  for suficientemente próxima de 0 (zero).

A maioria dos equipamentos de detecção ou medição estabelece a sua faixa dinâmica linear, no entanto, deve-se verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com essa faixa dinâmica e assegurar que nenhum outro fenômeno venha a se refletir nas medições. Na prática, para o ajuste de uma regressão linear às respostas de um método analítico ou bioanalítico, é interessante medir um ponto próximo desse limite, um segundo abaixo dele e um terceiro acima, ou pelo menos os dois últimos, e confirmar a validade desse limite.

Ainda, é preciso que a parte superior da curva esteja bem estabelecida para que se tenha boa medição em toda a extensão da reta. É preciso medir também concentrações próximas à região de “saturação” do método, ou seja, uma que esteja abaixo dessa região, e outra acima, além de testar se o máximo da regressão foi, realmente, atingido.

**Tabela 2.3.**

Verificações para estabelecer a faixa de trabalho e faixa linear.

N.º de Replicatas	Matriz	Objetivos e Procedimento
<b>Etapa 1</b> ≥ 7 por matriz ou concentração	Branco com adição de concentrações variadas do analito, ou: Branco da amostra com adição de concentrações variadas do analito Obs.: preparar diferentes concentrações de forma independente e não alíquotas da mesma solução-mãe (1)	Identificar, inicialmente, por observação visual, a faixa linear aproximada e limites superior e inferior da faixa de trabalho. Fazer gráfico XxY, ou seja, colocar concentração ensaiadas x respostas das respectivas medições. Passar para a Etapa 2.
<b>Etapa 2</b> ≥ 7 por matriz ou concentração na faixa linear	Materiais de referência (diferentes concentrações), na faixa linear, ou: Branco da amostra com adição de concentrações variadas do analito, na faixa linear.	Determinar a faixa de trabalho e confirmar a linearidade. Da mesma forma, fazer o gráfico XxY Verificar visualmente a existência de dispersos que possam interferir na regressão (antes de remover os dispersos, fazer determinações nas proximidades das concentrações). Calcular o coeficiente de regressão linear. Calcular e fazer o gráfico dos valores dos resíduos (diferença entre o valor observado e o valor calculado pela equação da reta de regressão para cada valor de x). Tendências sistemáticas indicam a não linearidade. Passar para a Etapa 3.
<b>Etapa 3</b> ≥ 7 por matriz ou concentração	Branco da amostra com adição de concentrações variadas do analito, próximas ao LD.	Determinar o Limite de Quantificação (LQ) que realmente seja o limite mais baixo da faixa de trabalho. Expressar o LQ como a concentração mais baixa do analito que pode ser determinada com incerteza aceitável (2).

(1) Trata-se de uma condição que, na maioria das vezes, é impraticável para um laboratório. Desse modo, o estatístico deve avaliar o grau de dependência nas medições. (2) Estabelecer qual seria o nível aceitável de incerteza e em que concentração ou matriz. Branco = água reagente; Branco da amostra = matriz da amostra sem o analito de interesse.

Fonte: INMETRO (2011).

Na ausência de orientação específica para a construção da curva de calibração, sugere-se utilizar as orientações descritas por THOMPSON; ELLISON e WOOD (2002), conforme seguem:

- deve haver seis ou mais padrões de calibração;
- os padrões de calibração devem ser uniformemente espaçados ao longo da gama de concentrações de interesse;
- o intervalo deve abranger 0-150% ou 50-150% da concentração provável de ser encontrada, dependendo de qual destas é a mais adequada;
- os padrões de calibração devem ser feitos pelo menos em duplicata, triplicata ou, de preferência, mais, numa ordem aleatória.

Ainda quanto à construção da curva de calibração, após o ajuste exploratório com regressão linear simples, os resíduos devem ser examinados bem como a homocedasticidade dos dados (THOMPSON; ELLISON e WOOD, 2002; INMETRO, 2011). Quando os resíduos se apresentarem heterocedásticos, recomenda-se que os dados da calibração sejam tratados pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP).

A quantificação do composto de interesse em validação pode ser obtida por meio dos seguintes métodos: padronização externa; padronização interna; superposição de matriz e adição-padrão, conforme abaixo descritas (RIBANI et al., 2004).

Na padronização externa, o método compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão.

A padronização interna consiste na preparação das soluções-padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto, chamado padrão interno. Após análise dessas soluções, constrói-se um gráfico, relacionando a razão de áreas (área da substância/ área do padrão interno que tem concentração constante) com a concentração (variada) da substância.

O método de superposição de matriz consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações numa matriz similar à da amostra, isenta da substância, e construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. O método de superposição de matriz pode ser utilizado para calibração, tanto com a padronização interna quanto com a padronização externa.

O método de adição-padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas.

Após análise dessas soluções, constrói-se um gráfico, relacionando a razão de áreas (área da substância/ área do padrão interno que tem concentração constante) com a concentração (variada) da substância.

O método de superposição de matriz consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações numa matriz similar à da amostra, isenta da substância, e construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. O método de superposição de matriz pode ser utilizado para a calibração, tanto com a padronização interna quanto com a padronização externa.

O método de adição-padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas.

## 4 Sensibilidade

A sensibilidade ( $S$ ) estipula a variação da resposta em termos da concentração do analito. Pode ser expressa pelo coeficiente de inclinação da reta ( $b$ ), e é estimada com a linearidade. Ela depende de uma série de fatores, naturalmente, daqueles que interferem na linearidade, além da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada, e é definida por:

$$S = \frac{\Delta x}{\Delta c},$$

onde:

$\Delta x$  é a variação da resposta (sinal analítico,  $y$ ) e

$\Delta c$  a variação da concentração do analito ( $x$ ).

A sensibilidade ( $S$ ) é frequentemente empregada para calcular os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).



## 5 Limite de detecção (LD)

Deve-se conhecer o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método, em especial, quando se trabalha com baixas concentrações ou elementos-traço, como resíduos de defensivos agrícolas ou contaminantes.

O limite de detecção pode variar em função do tipo de matriz/amostra e existem diversas formas de obtê-lo (Tabela 2.4).

**Tabela 2.4.**.....  
Procedimento para obtenção do limite de detecção.

Matriz	Cálculos	Observações
Branco da amostra	$\bar{x} + t(n-1, 1-\alpha) s$ , onde $\bar{x}$ é a média dos valores dos brancos da amostra; $t$ é o coeficiente da distribuição de T-Student, $n$ é o tamanho da amostra, $\alpha$ é o nível de significância de confiança e $s$ é o desvio-padrão amostral dos brancos da amostra.	A média e o desvio-padrão amostral dos brancos da amostra são dependentes da matriz.  Válido quando os valores dos brancos apresentarem um desvio-padrão amostral não nulo.
Ou		
Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito	$LD = 0 + t(n-1, 1-\alpha) s$ onde $t$ é o coeficiente da distribuição de T-Student, $n$ é o tamanho da amostra, $\alpha$ é o nível de significância de confiança e $s$ é o desvio-padrão amostral dos brancos da amostra com adição.	A menor concentração aceitável é aquela tida como a mais baixa para em que um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado.

..... Fonte: INMETRO (2011).

Muitos recomendam que avaliações independentes sejam realizadas em amostras com concentração igual ao limite de detecção estabelecido.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na RE n.º 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), recomenda análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. O documento orientativo do INMETRO (2011) sugere no mínimo sete repetições para a estimação do LD. Mas há riscos de falta de evidência suficiente para o teste necessário de hipóteses, e que cada caso deve ser tratado isoladamente.

No caso de métodos não instrumentais, como titulação, comparação de cor etc., segundo a RE n.º 899 (BRASIL, 2003), a obtenção de uma aproximação desse limite pode ser feita visualmente, e o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito visual esperado, como mudança de cor, turvação etc.

Para métodos como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG), absorção atômica, espectrofotometria etc., pode-se obter uma aproximação do limite de detecção usando 3 vezes o ruído da linha de base, além da análise de concentrações decrescentes. Ainda, pode-se admitir  $LD = (DP_a \times 3)/IC$ , onde  $DP_a$  é o desvio-padrão do intercepto das respostas com o eixo do analito usando, no mínimo, 3 curvas de calibração com concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação, e  $IC$  é a inclinação da curva;  $DP_a$  pode, também, ser um desvio-padrão obtido a partir de uma curva de calibração com número apropriado de amostras do branco.

## 6 Limite de quantificação (LQ)

O LQ é a menor quantidade ou concentração do analito numa amostra que pode ser determinada com precisão (nível de incerteza) e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. É muito usado em ensaios quantitativos e deve ser estabelecido usando-se amostras ou padrões apropriados.

Várias publicações o indicam como o resultado da média da medição de brancos acrescidos de 5, 6, ou 10 desvios-padrão dessas medições; em muitos ensaios é o ponto mais baixo na curva de calibração, excluindo o branco, e não deve ser determinado por extrapolação, ou pode ser estabelecido por meio do ruído. No último caso, estima-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal: ruído superior a 10:1.

Ainda, conforme a RE 899 (BRASIL, 2003), o LQ poderia ser aproximado por  $LQ = (DP_q \times 10)/IC_q$ , onde  $DP_q$  é o desvio-padrão do intercepto das respostas com o eixo do analito usando, no mínimo, 3 curvas de calibração com concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação, e  $IC_q$  é a inclinação da curva;  $DP_q$  pode, também, ser um desvio-padrão obtido a partir de uma curva de calibração com número apropriado de amostras de branco. A Tabela 2.5 traz outros procedimentos que também podem ser usados para obter valores aproximados de LQ.

**Tabela 2.5.**.....  
 Procedimentos para obtenção do limite de quantificação (LQ).

Matriz	Procedimento
Branco da amostra	$LQ = \bar{x} + 5 s$ , ou $LQ = \bar{x} + 6 s$ , ou $LQ = \bar{x} + 10 s$ , onde $\bar{x}$ é a média das medições.
Branco com adição de concentrações variadas do analito, próximas ao LD.	Medir independentemente a cada nível de concentração. Calcular o desvio-padrão amostral $s_i$ do valor do analito, para cada concentração $i$ .

Fonte: INMETRO (2011) adaptado.

Conforme a Tabela 2.5, usando-se medições próximas ao LD, seria interessante traçar o gráfico: resultados x concentração, e verificar se há tendência significativa na concentração que se admitir como possível LQ, bem como se a precisão da medição é significativamente menor que a aceitável nessa concentração. Sendo os testes significativos, continuar a experimentação com concentrações mais baixas. Para a análise de traços, o INMETRO (2011) recomenda adotar o LQ como a concentração mais baixa da curva analítica.

## 7 Robustez

É um parâmetro que estuda quais alterações o método pode suportar sem perder a confiabilidade, e sua verificação depende do tipo de método analítico. Com a verificação da susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, precauções para manter as condições de realização dos ensaios devem ser inclusas na rotina do emprego do método.

Em geral, para verificar a robustez de um método analítico deve-se:

- i. identificar as variáveis que poderiam ter um efeito significativo no desempenho do método;
- ii. planejar e realizar experimentos para avaliar o efeito de pequenas mudanças nos fatores variando-se: marcas ou pureza de reagentes, tempos de reação, eluição, outros tempos, preparo de amostras, quantidades de amostras utilizadas etc. e
- iii. verificar a existência de efeitos significativos para todos os fatores ensaiados, isolada e conjuntamente, na possibilidade de efeito sinérgico, como: tempo e temperatura de reação.

Caso alguns efeitos significativos sejam obtidos na análise estatística do modelo experimental previsto no planejamento, os fatores correspondentes, isoladamente ou em conjunto, deverão ser mantidos sob rígido controle. Na impossibilidade de manutenção desse controle, cada efeito deve ser estimado e os resultados das medições devem ser corrigidos por meio das estimativas obtidas.

A Tabela 2.6 apresenta as variáveis ou aspectos passíveis de serem verificados para a análise da robustez do método nas diferentes etapas e métodos usados no ensaio.

**Tabela 2.6.**.....  
Fatores a serem estudados na verificação de robustez.

Etapa / Ensaio	Fator
Preparo das amostras	Estabilidade das soluções e Tempos de extração
Espectrofotometria	Variação de pH da solução, Temperatura Diferentes fabricantes de solvente
Cromatografia líquida	Variação do pH da fase móvel, Composição da fase móvel, Diferentes lotes ou fabricantes de colunas, Temperatura e Fluxo da fase móvel
Cromatografia gasosa	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas Temperatura e Velocidade do gás de arraste

..... Fonte: BRASIL (2003)

## 8 Exatidão e tendência (bias)

A exatidão de um método é definida como a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. Comumente é expressa em termos de tendência (erro sistemático) e verifica-se esse parâmetro de validação (ou de comportamento) de um método usando-se: materiais de referência (MRC, MR, certificados ou não, padrões e materiais secundários, por vezes originados no próprio processo de validação - revalidação), ensaios de recuperação em amostras fortificadas e participação em comparações interlaboratoriais (ensaios de proficiência, medições por laboratórios acreditados ou outros) e ensaios de recuperação em amostras fortificadas.

A tendência, ou exatidão, é algumas vezes a recuperação de um método analítico - o erro sistemático desse método -, e comum nos métodos em que se emprega correção pela recuperação.

Pode-se, então, expressar e estimar a exatidão de duas maneiras: como função da diferença entre a concentração resultante e a concentração adicionada (ou conhecida) na matriz em índices especialmente estipulados, ou como um índice em percentual relativo à concentração adicionada (ou conhecida).

Comumente se estima a exatidão em diversas matrizes ou diversas concentrações do método, empregando-se várias repetições. O número de repetições requerido também não é, absolutamente, fixado em nenhuma regra que não dependa do método, das matrizes ou das concentrações examinadas.

A recuperação num ensaio com tendência natural pode ser estimada como a média de:  $R(\%) = [(C_1 - C_2)/C_3] \times 100$ , com  $C_1$  a concentração medida na amostra fortificada,  $C_2$  a concentração medida na amostra não fortificada e  $C_3$  a concentração adicionada.

Ao se estimar a exatidão em outros ensaios, pode-se usar a recuperação acima ou outros estimadores, como exatidão (%) = concentração média experimental x 100 / concentração teórica. Nesses casos, os testes de hipóteses para a exatidão terão 100% como o valor de exatidão testado.

Quando se estuda a exatidão utilizando-se um material de referência certificado (MRC), não se deve restringir o trabalho à exatidão, mas os MRCs, muitas vezes trazem dados de precisão que também devem ser usados e comparados com os valores obtidos pelo laboratório. Nessa comparação, podem ser utilizados diversos estimadores de exatidão, entre os quais: erro relativo; *z score*, erro normalizado ou outros.

## Alguns estimadores de tendência (erro sistemático)

### Erro relativo (%) (INMETRO, 2011)

Em geral, no emprego de material de referência certificado, o erro relativo é expresso com base no valor-referência (valor certificado, valor designado, teor adicionado) da média do MRC, conforme:

$$ER(\%) = \frac{\bar{x} - \mu_c}{\mu_c} \times 100$$

onde: ER(%) é o erro relativo,  $\bar{x}$  é a média das medições e  $\mu_c$  a média certificada (valor referência ou valor designado). Erro similar pode ser usado para outros materiais de referência.

### Índice z (z score) (THOMPSON et al., 2006; INMETRO, 2011)

O estimador de exatidão mais frequentemente usado tem sido o *score z*, que é estimado conforme:

$$Z = \frac{\bar{x} - \mu_c}{S}$$

Com Z - o score z,  $\bar{x}$  a média das medições,  $\mu_c$  a média certificada (valor--referência ou valor designado) e  $s$  o desvio-padrão (incerteza-padrão) do MRC (ou MR ou valor designado ou outro estimado).

Porém esse mesmo score z é usado em ensaios de proficiência, em que se admite esse escore como uma nota do desempenho do laboratório. Considere-se o desempenho do laboratório satisfatório quando  $|z| \leq 2$ , questionável se  $2 < |z| < 3$ , e insatisfatório caso  $|z| \geq 3$ .

### Erro normalizado $E_n$ (THOMPSON et al., 2006; INMETRO, 2011)

O erro normalizado é definido como uma estatística padronizada, ou seja, uma estatística de média zero e variância (incerteza) um. Seu estimador é do tipo

$$E_n = \frac{\bar{x} - \mu_r}{U_{lab}^2 + U_r^2}$$

Onde  $\bar{x}$  é a média obtida pelo laboratório,  $\mu_r$  média-referência (ou designada),  $U_{lab}^2$  a incerteza-expandida (desvio-padrão) obtida no laboratório e  $U_r^2$  a incerteza expandida do MR (ou designada).

Quando  $|E_n| \leq 1$ , a tendência do laboratório é considerada adequada conforme INMETRO (2011).

## 9 Precisão

Precisão de um método é o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes que avalia a dispersão desses; normalmente é expressa em termos de algum desvio-padrão (desvio-padrão amostral, desvio-padrão

da repetibilidade, desvio-padrão da reprodutibilidade, desvio-padrão da repetibilidade intermediária, desvio-padrão da reprodutibilidade etc.) ou desvio-padrão relativo (DPR ou RSD – *Relative Standard Deviation*), também chamado de coeficiente de variação.

Repetitividade e reprodutibilidade são duas formas de precisão cuja nomenclatura é especificamente empregada em química conforme a série *International Standard Organization* (ISO) 5725 – 1 a 6:1994. O modelo decompõe a precisão (variabilidade) de medições analíticas em: parte referente à variabilidade dentro de laboratórios e outra parte relativa à variação entre laboratórios.

Pelos objetivos dos experimentos de precisão na série ISO 5725, depreende-se que ambas são medidas médias de precisão de um método, estimadas a partir de uma amostra de laboratórios que pode ser considerada representativa de bons laboratórios nas matrizes pesquisadas. Por esse motivo, adotou-se a nomenclatura de repetibilidade intralaboratorial, reprodutibilidade intralaboratorial.

## Conceituação e cálculo do limite da repetibilidade ( $r$ )

A repetibilidade é um tipo de precisão em métodos analíticos que se refere a medições feitas com o mesmo método, mesmo material, mesmo operador e mesmo laboratório (VIM, 2012). Essas condições são chamadas condições de repetibilidade, e por meio de experimentos nessas condições se obtém o limite da repetibilidade:  $r = 2,8 s_r$ , onde  $s_r$  é o desvio-padrão da repetibilidade obtido pelo componente de variância dentro do laboratório no modelo a um critério de classificação.

## Conceituação e cálculo do limite da reprodutibilidade ( $R$ )

Reprodutibilidade é um tipo de precisão em métodos analíticos referente a medições feitas com o mesmo método, operadores diferentes, laboratórios diferentes e equipamentos diferentes. É especialmente útil quando um laboratório busca verificar o comportamento das medições dos seus métodos por comparação interlaboratorial.

O limite de reprodutibilidade  $R = 2,8 s_R$ , onde  $s_R$  é o desvio-padrão da reprodutibilidade obtida por meio do componente de variância dentro dos laboratórios e entre os laboratórios, sendo  $s_R = (s_{dentro}^2 + s_{entre}^2)^{1/2}$ . As componentes de variância  $s_{dentro}^2$  e  $s_{entre}^2$  são calculadas a partir da análise de variância

com um critério de classificação (ANOVA-fator único). O valor da variância  $s^2_{dentro}$  é igual aos quadrados médios dentro dos laboratórios ( $QM_{dentro}$ ), ou seja,  $s^2_{dentro} = QM_{dentro}$ . O valor da variância,  $s^2_{entre}$ , é calculada pela diferença entre os  $QM_{dentro}$  e  $QM_{entre}$  (quadrados médios entre) dividido pelo número de replicadas realizadas em cada laboratório ( $n$ ) e, ( $s^2_{entre} = (QM_{dentro} - QM_{entre})/n$ ) (CHUI et al., 2009).

## Precisão Intermediária

Trata-se de precisão de uma amostra, amostras idênticas ou padrões, obtida utilizando-se o mesmo método no mesmo laboratório, definindo qual (is) a(s) condição (ões) a ser (em) variadas(s), como analistas e equipamentos, períodos de tempo extensos etc.

Para se estimarem as precisões, alguns autores recomendam empregar o mínimo de sete observações (medições, repetições) por matriz. Deverão ser estudados padrões, materiais de referência ou amostras fortificadas em várias concentrações.

Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermediária, existem vários métodos para a determinação e controle desse parâmetro, tais como:

- por meio de gráfico de controle do desvio-padrão, que poderá ser aplicado para replicatas de amostras e para padrões estáveis ao longo do tempo;
- por meio da expressão I:

$$Si_{j,k} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}$$

Onde:

$Sp_{i(j,k)}$  = desvio-padrão de precisão intermediária;

$t$  = total de amostras ensaiadas (não confundir com o  $t$  de *Student*);

$n$  = total de ensaios efetuados por amostra;

$j$  = n.º da amostra,  $j = 1, t$ ;

$k$  = n.º do ensaio da amostra  $j$ ,  $k = 1, n$ ;

$y_{jk}$  = valor do resultado  $k$  para a amostra  $j$ ;

$\bar{y}_j$  = média aritmética dos resultados da amostra  $j$ .



Nesse caso, a determinação da precisão intermediária é feita por meio de  $t$  valores de  $n$  ensaios de amostras ou padrões. A precisão intermediária baseia-se na dispersão entre ensaios. É recomendado que o valor “ $t(n-1)$ ”, seja, no mínimo, igual a 15. Quando  $n = 2$  a equação I toma a forma da equação II como segue:

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{2.t} \cdot \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2}$$

Um método simplificado para estimar a precisão intermediária baseia-se na execução de  $n$  medições ( $n \geq 15$ ), em condições pré-definidas, sobre:

- uma mesma amostra;
- amostras supostamente idêntica;
- padrões.

A estimativa da precisão intermediária ( $Si$ ), nesse caso, é dada pela expressão III abaixo. Contudo este método revela-se menos eficiente quando comparado com os anteriores.

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

Onde:

$Si(j, k)$  é o desvio-padrão de precisão intermediária relativa a esse grupo; os símbolos relativos às condições intermediárias de precisão podem aparecer entre parênteses. Ex.:  $Si(T, O_n)$  significa tempo (T) e identificação dos diferentes operadores ( $O_n$ ), respectivamente;

$n = n.^{\circ}$  de ensaios efetuados por amostra ou padrão;

$y_k =$  cada resultado obtido;

$\bar{y} =$  a média aritmética de cada resultado obtido.

A Tabela 2.7 menciona os procedimentos a serem realizados na precisão intralaboratorial, enquanto a Tabela 8 apresenta os procedimentos para a

obtenção da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

**Tabela 2.7.**.....  
 Procedimentos para a obtenção de estimativas de precisão intralaboratorial.

Precisão	Condições <sup>(1)</sup>
Repetibilidade	Dentro de um laboratório, usando o mesmo equipamento, mesmo analista, período curto de tempo.
Reprodutibilidade intermediária	Dentro de um laboratório usando longo período de tempo, ou variando-se um ou os dois: equipamentos e analistas.
Reprodutibilidade	Diferentes laboratórios, diferentes equipamentos, diferentes analistas. Necessita de um experimento de precisão (estudo colaborativo).

(1) *International Standard Organization 5725 – 1 a 6:1994; EURACHEM/CITAC (2000).*

**Tabela 2.8.**.....  
 Repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Analisa padrões, materiais de referência ou amostras fortificadas em várias concentrações (na faixa de trabalho). Condições de análise:	Repetições	O que calcular com os dados?	O que determinar?
Mesmo analista, equipamento, laboratório, período curto (Repetibilidade).	$\geq 7$	Desvio - padrão amostral (s) de cada concentração	Desvio-padrão amostral de repetibilidade de cada concentração.
Analistas e equipamentos diferentes, mesmo laboratório, período estendido (precisão intermediária)	$\geq 7$	Desvio - padrão amostral (s) de cada concentração	Desvio-padrão da reprodutibilidade intralaboratorial de cada concentração.
Analistas, equipamentos e laboratórios diferentes, período estendido (reprodutibilidade).	$\geq 7$	Desvio - padrão amostral (s) de cada concentração	Desvio-padrão da reprodutibilidade intralaboratorial de cada concentração. Requer estudo colaborativo.

..... Fonte: INMETRO, 2011 .....

O laboratório deve realizar o maior número de repetições técnica e econo-

micamente viáveis, pois, se o número de repetições for pequeno, as conclusões, para uma determinada confiabilidade, podem não ter utilidade prática ou o erro maior que o admissível. A ISO 5725 – 3:1994 que trata de precisão intermediária recomenda que sejam efetuadas no mínimo 15 repetições.

No caso de qualquer um dos tipos de precisões citados, o coeficiente de variação é definido conforme  $cv(\%) = (100 \times \underline{\sigma})/\mu$ , onde  $\underline{\sigma}$  é desvio-padrão e  $\mu$  a concentração média do analito na matriz. Esse coeficiente é comumente estimado por  $cv(\%) = DPR(\%) = (100 \times s)/x$  onde  $s$  é o desvio-padrão amostral e  $x$ , a concentração média do analito determinada na matriz.

No caso de não haver método com os quais possam ser comparadas as características de precisão, então os valores teóricos de repetibilidade e reprodutibilidade podem ser calculados a partir da equação de Horwitz. A forma mais adequada é o uso dos valores de HorRat para avaliar a aceitabilidade das características de precisão de um método.

O valor de HorRat é dado por:

$$HorRat = \frac{cv_{R-Exp.} \text{ (estimado experimentalmente)}}{cv_{R-H} \text{ (previsto pela equação de Horwitz)}}$$

Assim, o valor *HorRat* para reprodutibilidade, é o valor do coeficiente de variação da reprodutibilidade ( $cv_{R-exp.}$ ) dividido pelo valor do coeficiente de variação da reprodutibilidade ( $cv_{R-H}$ ) calculado com base na equação de *Horwitz*, para a concentração de interesse.

Se os valores de *HorRat* forem menores ou iguais a 2, os valores de reprodutibilidade do método podem ser considerados satisfatórios. Os laboratórios devem-se assegurar de que os métodos que eles empregam atendem esse critério (INMETRO, 2011).

O valor de *Horwitz* é derivado da equação de *Horwitz*, que estabelece para qualquer método (considera-se a concentração C como valor adimensional):

$$cv_{R-H} = 2^{(1-0,5\log C)}$$

Contudo esse valor independe da matriz/analito, apenas da concentração (C),

com os principais valores elencados na Tabela 2.9.

**Tabela 2.9**.....  
Concentração média do analito na matriz e o desvio-padrão da reprodutibilidade.

Razão de Concentração	CV <sub>R-H</sub>
1 (100%)	2,0
10 <sup>-1</sup>	2,8
10 <sup>-2</sup> (1%)	4,0
10 <sup>-3</sup>	5,6
10 <sup>-4</sup>	8,0
10 <sup>-5</sup>	11,0
10 <sup>-6</sup> (ppm)	16,0
10 <sup>-7</sup>	23,0
10 <sup>-8</sup>	32,0
10 <sup>-9</sup> (ppb)	45,0

## 10 Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA). Resolução n.º 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.

CHUI, Q. S. H.; BARROS, C. B.; SILVA, T. D. Parâmetros r e R obtidos de programa interlaboratorial - como usá-los. **Química Nova**, v. 32, p. 2209 - 2213, 2009.

EURACHEM/CITAC Working Group. **EURACHEM/CITAC Guide, Quantifying uncertainty in analytical measurement**. 2.ed. Teddington: EURACHEM/CITAC, 2000, 122 p.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos. Documento de caráter orientativo. DOQ – CGCRE - 008**. Revisão 04 de julho de 2011. 19 p.

International Standard Organization (ISO) 5725 - 1:1994. **Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 1: General principles and definitions**.

International Standard Organization (ISO) 5725 - 2:1994. **Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 2: Basic Method for the Determination of Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method**.

International Standard Organization (ISO) 5725 - 3:1994. **Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 3: Intermediate Measures of Precision of a Standard Measurement Method**.

International Standard Organization (ISO) 5725 - 4:1994. **Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 4: Basic Methods for the Determination of the Trueness of a Standard Measurement method**.

International Standard Organization (ISO) 5725 - 6:1994. **Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 6: Use in Practice of Accuracy Values.**

LABORATORY of Government Chemists, LGC; **Valid Analytical Measurement. VAM. In: House method validation - A guide for chemical laboratories.** Teddington: LGC, 2003, 56 p.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. São Paulo: **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771 - 780, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for the single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report ). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835 - 855, 2002.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. **Pure and Applied Chemistry**, v.78, n.1, p.145 - 196, 2006.

# APLICAÇÃO DE VALIDAÇÃO EM ANÁLISE CENTESIMAL DE ALIMENTOS

*Ana Lucia de Matheus e Silva  
Carla Ivone Carraro  
Elaine M. de Azevedo Mazon  
Elza T. Grael Marasca  
Gilberto Batista de Souza  
Igor Renato B. Olivares  
Márcia R. Cucatti Alves  
Mary Ângela F. Perez  
Merenice Roberto Sobrinho  
Valquíria T. D'Almeida  
Vera Sônia Nunes da Silva  
Vitor Hugo Polisél Pacces  
Yolanda Boza*

## 1 Introdução

Os estudos sobre a composição de alimentos tiveram início a partir do século XVII com a publicação da teoria de combustão em 1665, por Robert Hooke.

O século XIX apresentou inúmeros avanços nos estudos sobre respiração e calorimetria que permitiram maior entendimento sobre a produção de energia obtida dos alimentos e as necessidades energéticas do homem. Os trabalhos pioneiros sobre metabolismo foram de Von Voit, professor de fisiologia da University of Munich, com Pettenkofer, que influenciaram Henneberger. Em

1850 Henneberger e Stohmann chefiam um grupo alemão de pesquisa, iniciando a análise de composição centesimal em ração animal – denominado método Weende, tornando-se um procedimento também aplicável em alimentos com algumas adaptações. Embora inúmeras pesquisas tenham sido realizadas, somente após a II Guerra Mundial os estudos sobre a composição de alimentos foram ampliados (GIUNTINI, LAJOLO e DE MENEZES, 2006).

Segundo os mesmos autores, a partir dos anos de 1960, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) vem promovendo, por intermédio de um processo de cooperação internacional, condições para a criação de tabelas regionais, com o objetivo de promover o uso sustentável da biodiversidade em programas de segurança alimentar e nutrição humana, evidenciando importância dos dados de composição dos alimentos no estabelecimento do elo entre nutrição e biodiversidade para a eficácia da implementação de programas de segurança alimentar e nutricional.

Os dados obtidos sobre composição de alimentos, in natura e processados, são essenciais para avaliar o suprimento e o consumo alimentar, verificar a adequação da dieta e o estado nutricional de indivíduos e de populações e, ainda, obter informações sobre a adequação das condições de processamento – no caso dos alimentos processados. Cabe ainda salientar que as informações sobre a composição dos alimentos são importantes e fornecem subsídios para diversos segmentos como: nutrição, agricultura, indústria, comércio e marketing, além de nortear estudos epidemiológicos relacionados com a dieta e políticas públicas de segurança alimentar (TORRES et al., 2000; TACO, 2011).

Quanto ao aspecto regulatório, há uma crescente demanda de conhecimento e controle sobre a composição dos alimentos. No Brasil, com publicação das Resoluções RDC n.º 39 - *Tabela de Valores de Referência para Porções de Alimentos e Bebidas Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional* e a RDC n.º 40 – *Regulamento Técnico para Rotulagem Nutricional Obrigatória de Alimentos e Bebidas Embalados*, a Informação Nutricional tornou-se mandatória, para todos os alimentos e bebidas embalados. A partir de 21 de setembro de 2001, além de informações gerais, os rótulos dos ingredientes e produtos alimentícios passaram a conter as seguintes informações: Valor Calórico, Carboidratos, Proteínas, Gorduras Totais, Gorduras Saturadas, Colesterol, Fibra Alimentar, Cálcio, Ferro e Sódio. E, de acordo com a RDC n.º 360 de 23 de dezembro de 2003 - *Rotulagem Nutricional*, é admitida uma tolerância de no máximo 20% em relação aos valores de nutrientes declarados no rótulo (BRASIL, 2003).

É crescente/contínua e dinâmica a demanda por análises de ingredientes e de produtos alimentícios realizadas por laboratórios com competência analítica comprovada e em consonância com critérios internacionais. Essa demanda é decorrente dos avanços no melhoramento genético de vegetais e animais, das mudanças de hábito da população, da introdução (importação) e dos constantes lançamentos de produtos no mercado. A competência analítica dos laboratórios do País é essencial no mercado globalizado, uma vez ser crescente a participação do Brasil nas exportações mundiais de *commodities* agropecuárias (USDA, 2014). O desenvolvimento dos processos produtivos das organizações brasileiras, de acordo com normas e procedimentos harmonizados e/ou aceitos como padrões, promove condições para superar possíveis barreiras não tarifárias, para atender requisitos técnicos específicos e/ou para resultar em diferencial competitivo.

Com o objetivo de facilitar o entendimento dos processos de validação dos métodos analíticos na análise centesimal de ingredientes e produtos alimentícios, optamos por duas matrizes, uma de origem animal e outra de origem vegetal, para demonstrar os procedimentos experimental e estatístico de validação bem como a indicação de pontos críticos de controle durante a execução das análises dos diferentes componentes para melhorar o desempenho analítico do laboratório.

Os capítulos 4 a 8 referem-se à validação para análise de proteína, umidade, cinzas, gordura total e fibra alimentar, respectivamente. As matrizes selecionadas foram Farinha de Soja e Mortadela. A primeira devido à proteína de alta qualidade dos alimentos e de ingredientes à base de soja, pois o interesse do consumidor em produtos à base de proteína de soja tem aumentado rapidamente nas culturas ocidentais nos últimos anos. Ainda, alegações de saúde de que o consumo diário de 25 g de proteína de soja pode melhorar a saúde cardiovascular (HAWKES, 2006) tornam especialmente importante a determinação do teor de proteína em produtos de soja. A segunda, a mortadela, é um produto cárneo de alto consumo, por ser de fácil poder aquisitivo, um dos principais produtos cárneos fabricados no Brasil, obtido de uma emulsão das carnes de animais de açougue, acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas, e submetido ao tratamento térmico adequado (BRASIL, 2000).



## 2 Referências

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico para Rotulagem nutricional obrigatória de alimentos e bebidas embaladas. **Resolução RDC n.º 360, de 23 de dezembro de 2003.**

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico para Rotulagem nutricional obrigatória de alimentos e bebidas embaladas. **Resolução RDC n.º 40, de 08 de fevereiro de 2002.**

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamentos técnicos de valores de referência para porções de alimentos e bebidas embalados para fins de rotulagem nutricional. **Resolução RDC n.º 39, de 21 de março de 2001.**

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa n.º 4, de 04 de março de 2000. Anexo II. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Mortadela.**

GIUNTINI, E. B.; LAJOLO, F. M.; DE MENEZES, E. W. Composição de alimentos: um pouco de história. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 56 (3), p. 295 - 303, 2006.

HAWKES, C. **Rotulagem: Informação Nutricional e Alegações de Saúde: o Cenário Global das Regulamentações. Organização Mundial da Saúde –** Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2006. 116 p.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – **TACO**. 4. edição rev. e ampliada – Campinas: Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação da Universidade Estadual de Campinas (NEPA/UNICAMP) - UNICAMP, 2011. 161p.

TORRES, Elizabeth A.F.S. *et al.* Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20 (2), p. 145 -150, 2000.

USDA - **United States Department of Agriculture’s Agricultural Marketing Service.** Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0>> . Acesso em 30 dez. 2014.

# PROTEÍNA

*Gilberto Batista de Souza  
Vera Sonia Nunes da Silva  
Yolanda Boza*

## 1 Introdução

A fração proteica dos alimentos além do valor nutricional, pelo fornecimento de aminoácidos essenciais e peptídeos bioativos, contribuem para suas propriedades sensoriais como textura, aroma e sabor, as quais são determinantes na aquisição e no consumo dos alimentos.

Na indústria de alimentos há uma grande variedade de matérias - primas de origem animal e vegetal, destinadas ao processamento e à obtenção de produtos e de ingredientes. Em consequência da importância da fração proteica nos alimentos sob os aspectos nutricional, funcional e tecnológico, sua adequada quantificação é requisito essencial para adequar condições de processamento, padronizar e garantir a qualidade de seus produtos e, ainda, para fins de rotulagem (HAWKES, 2006).

Muitos alimentos são negociados com base no teor de proteínas, teor determinante no valor de mercado de várias *commodities* agrícolas, incluindo grãos de cereais, leguminosas, oleaginosas, farinha, leite e rações animais (WILES; GRAY; KISSLING, 1998; KROTZ; CICERCI; GIAZZI, 2008). Como o Brasil é um dos maiores exportadores mundiais dessas *commodities* agrícolas, o teor de proteína desses produtos é um dos determinantes do PIB do País (BNDS, 2011).

Nesse contexto, ressalta-se a importância para a garantia da qualidade dos resultados analíticos do teor de proteínas em diversas matrizes de alimentos, principalmente quanto não apenas à exatidão e à precisão dos métodos, como também à comparabilidade dos resultados intra e interlaboratorial.

## 2 Método de Kjeldahl

O método de Kjeldahl é executado em três principais etapas: digestão da amostra, destilação do nitrogênio e titulação. Esse método quantifica o teor de nitrogênio total e estima indiretamente o teor de proteína dos alimentos por meio da multiplicação por um fator de conversão (Tabela 4.2). Embora seja difícil definir um procedimento comum aplicável a todas as matrizes de alimentos, o método é referência/padrão para quantificar proteína em alimentos (MOORE et al. 2010; LYNCH; BARBANO, 1999).

Desde a sua publicação em 1883, o método de Kjeldahl tem passado por adaptações, as quais foram padronizadas e validadas para se estimar o teor de proteína total (proteína bruta) de vários tipos de matrizes alimentícias e publicadas pela *American Oil Chemists' Society (AOCS)*, *Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International*, *American Association of Cereal Chemists (AACC)* e *International Organization for Standardization (ISO)* (PERSSON; WENNERHOLM; O'HALLORAN, 2008). A Comissão das Comunidades Europeias, visando à padronização dos procedimentos analíticos para fins comerciais, publicou em 27 de janeiro de 2009 o Regulamento (CE) N.º 152/2009 no qual adota o método de Kjeldahl para análise e controle oficial dos alimentos.

### 2.1 Etapas do método de Kjeldahl

**Digestão da amostra:** nessa etapa, toda a matéria orgânica da amostra é oxidada e o nitrogênio orgânico convertido a amônio ( $N-NH_4^+$ ) com o emprego de ácido sulfúrico concentrado, sais catalisadores da reação ( $K_2SO_4$  ou  $Na_2SO_4$ ), para elevar a temperatura de ebulição do ácido sulfúrico e catalisadores como o Se, Hg ou Cu para aumentar a velocidade de oxidação da matéria orgânica. Essa etapa deve ser realizada à temperatura de 370°C e não deve ultrapassar a temperatura de 400°C;

**Destilação:** após a digestão ácida da amostra, os compostos nitrogenados são decompostos em sulfato de amônio. Este transferido para o conjunto de

destilação por arraste a vapor, na presença de solução de hidróxido de sódio, libera amônia, a qual é destilada e coletada em solução de ácido bórico na presença de indicadores de pH.

**Titulação e quantificação:** a solução de borato de ácido de amônio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ ), formada a partir da destilação, adquire coloração azulada devido à mudança de pH da solução. A concentração remanescente de ácido bórico é determinada por titulação com solução de hidróxido de sódio padronizada e a concentração de nitrogênio é calculada por diferença. Para calcular a concentração de proteína bruta, multiplica-se o teor de nitrogênio total encontrado na amostra por um fator de conversão (Tabela 4.2), considerando a característica de cada matriz.

### Informações importantes:

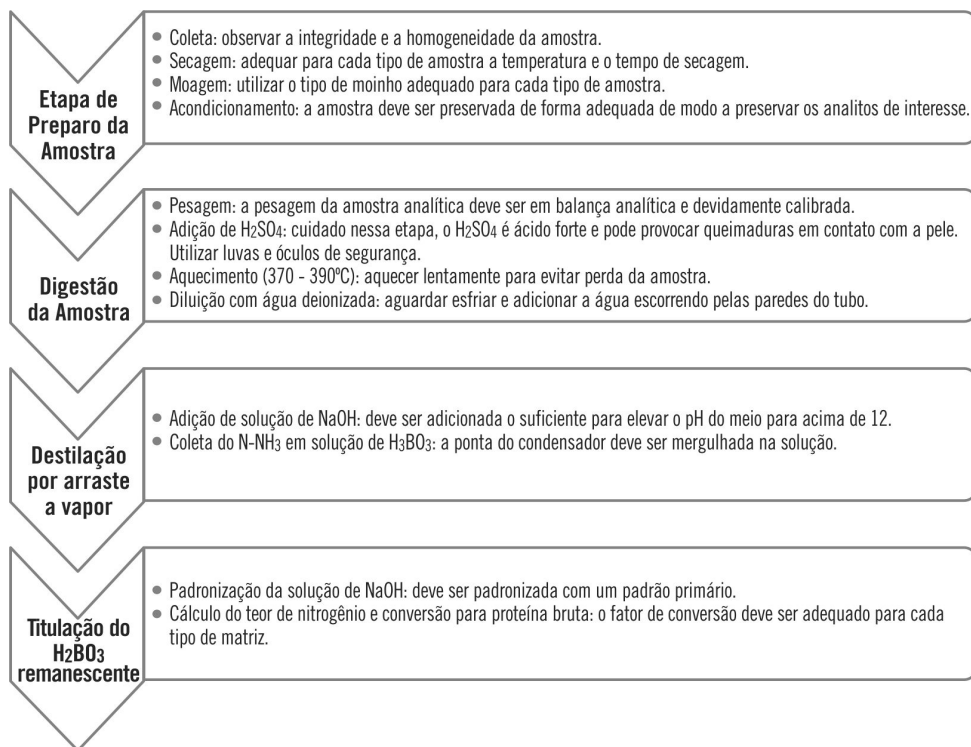
- o final da etapa de digestão é caracterizado pela coloração verde-claro da solução;
- o volume de ácido sulfúrico necessário para a decomposição da amostra depende da massa da amostra utilizada, das características físicas e químicas da amostra e da taxa de aquecimento;
- diferentes catalisadores têm sido propostos para acelerar o processo de digestão da amostra, sendo relatada a seguinte ordem de eficácia dos catalisadores metálicos:  $\text{Hg} > \text{Se} > \text{Te} > \text{Mo} > \text{Fe} > \text{Cu} > \text{V} > \text{W} > \text{Ag}$ . Embora o mercúrio seja o catalisador mais efetivo, tem sido sucessivamente substituído por outros catalisadores menos eficientes, porém menos poluentes e de menor custo (FLORENCE; HARRIS; MILNER, 1985; PRIECE, 1994);
- o selênio como catalisador da digestão tem sido especialmente usado na forma de misturas, tal como sulfato de potássio, sulfato de sódio e pó de selênio. Também o uso de cobre como catalisador na etapa de digestão é cada vez mais comum. Atualmente o selênio e o cobre têm sido usados como catalisadores em mais de 90% das digestões Kjeldahl;
- após a digestão, deve ser adicionada água para prevenir a precipitação devido à saturação e baixa solubilidade em ácido sulfúrico dos sais utilizados como catalisadores.
- o método pode ser executado nas condições micro-Kjeldahl, semimicro-Kjeldahl ou macro-Kjeldahl. Os parâmetros que diferem um do outro são: massa de amostra (variando de miligramas a gramas), volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  utilizado, tamanho das vidrarias utilizadas e equipamentos de digestão e

destilação. O fator determinante na escolha do método de Kjeldahl é a concentração esperada de nitrogênio na amostra e a massa de amostra disponível/requerida para a análise. Cabe salientar que a quantidade de amostra a ser analisada depende do teor de nitrogênio esperado e do grau de homogeneidade do material.

## 3 Determinação de proteína bruta em farinha de soja e mortadela

### Proposta de procedimento analítico

A determinação de proteína em Mortadela e em Farinha de Soja (esquemática na Figura 1) foi realizada segundo o *Official Method* - 981.10 (AOAC, 1990) e BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa n.º 20, de 21 de julho de 1999. Anexo - Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes - Sal e Salmoura, respectivamente.



**Figura 4.1.** .....  
Fluxograma de determinação de proteína em farinha de soja e mortadela.

## 4 Resultados e Discussão

O desempenho do laboratório para as análises de proteína pelo método de Kjeldahl em farinha de soja e mortadela foi avaliado por precisão, quanto à repetibilidade e reprodutibilidade, e pela exatidão dos resultados.

### 4.1 Precisão quanto à Repetibilidade

A precisão foi determinada em condições de repetibilidade, ou seja, por meio de 7 determinações independentes realizadas pelo mesmo analista, utilizando o mesmo material e as mesmas condições de ensaio (reagentes e equipamentos). Os resultados obtidos para a análise de proteína estão apresentados no Quadro 4.1.

#### Quadro 4.1.....

Valores do teor de proteína para as amostras de mortadela e de farinha de soja analisada em condições de repetibilidade.

Amostra	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	PB (g/100g)						
Mortadela	12,6	12,7	12,7	12,2	11,8	12,2	11,3
Farinha de soja	32,3	32,8	32,5	33,0	33,0	32,7	32,8
Dados estatísticos							
	$\bar{x}$ (g/100g)	$r = s_r$ (g/100g)	$CV_r$ (RSD <sub>r</sub> ) (%)	$s^2$	$r = 2,8 \times$ $s_r$	$CV_{Horwitz}$ (%)	HorRat <sub>r</sub>
Mortadela	12,2	0,52	4,3	0,271	1,46	2,7	1,6
Farinha de soja	32,7	0,26	0,8	0,069	0,73	2,4	0,3

R1 a R7 = repetições independentes do ensaio para cada matriz; M = média;  $s_r$  = estimativa do desvio-padrão de repetibilidade;  $CV_r$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de repetibilidade; HorRat<sub>r</sub> = valor HorRat de repetibilidade;  $CV_{Horwitz}$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de repetibilidade predito pela equação de Horwitz.

O laboratório obteve índices de repetibilidade (r) para análise de proteína em mortadela e farinha de soja de 1,46% e 0,73%, respectivamente.

Em seguida, foi avaliada se a precisão quanto à repetibilidade era aceitável, utilizando-se o valor de HorRat calculado com base na relação entre o coeficiente de variação obtido em condições de repetibilidade ( $CV_r$ ) e o coeficiente de variação predito por meio da equação de Horwitz ( $CV_{Horwitz} = 2^{1-0,5 \log c}$ , onde c é a concentração média de proteína na amostra). Se o valor HorRat for  $\leq 2,0$ , assume-se que a precisão do método quanto à repetibilidade é satisfatória (WOOD, 1999). No exemplo, os valores HorRat obtidos foram 1,6 e 0,3 para mortadela e farinha de soja, respectivamente, e, portanto, os resultados das análises de proteína bruta para amostras de mortadela e farinha de soja foram considerados satisfatórios quanto à repetibilidade.

### Exemplos de aplicação do índice de repetibilidade (r) na rotina do laboratório

a) **Proteína Bruta em amostra de mortadela:** o laboratório realiza análises em duas replicatas e obtém os seguintes resultados: 12,7% e 13,1%. Nesse caso, a diferença entre as replicatas é de 0,4%, inferior ao valor de r (igual a 1,46%), portanto os dois resultados são válidos. Se o valor de r tivesse sido superior a 1,46%, haveria necessidade de se fazer uma replicata, comparar os resultados e, no caso, excluir os resultados cuja diferença estivesse acima do valor do índice de repetibilidade.

**b) Proteína Bruta em amostra de farinha de soja:** o laboratório realiza análises em duas replicatas e obtém os seguintes resultados: 31,9% e 31,1%. Nesse caso, a diferença entre as replicatas é de 0,8%, superior ao valor de  $r$  (igual a 0,73%). Nesse caso, haverá necessidade de se realizar outra determinação. O valor obtido para a terceira replicata foi de 31,3%, comparando-se com o valor de 31,1%, a diferença é de 0,2% e, portanto, inferior ao valor do índice de repetibilidade, considerado resultado válido. Quando comparado com o valor de 31,9%, a diferença é de 0,46% e, nesse caso, o resultado deve ser rejeitado.

## 4.2 Precisão quanto à Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi determinada considerando uma comparação interlaboratorial, ou seja, o teor de proteína nas amostras de mortadela e de farinha de soja foi determinado por três laboratórios diferentes (laboratório A, B e C). Cada laboratório realizou 7 determinações independentes, utilizando o mesmo método analítico. Os resultados estão apresentados no Quadro 4.2.

**Quadro 4.2.** Teores de proteína para as amostras de mortadela e de farinha de soja analisadas em condições de reprodutibilidade (precisão intermediária).

Amostra		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
		Proteína (g/100g)						
Mortadela	Laboratório A	12,6	12,7	12,7	12,2	11,8	12,2	11,3
	Laboratório B	12,3	11,7	12,8	11,4	11,3	12,7	11,5
	Laboratório C	12,7	11,8	12,2	11,5	11,3	11,4	11,7
Farinha de soja	Laboratório A	32,25	32,32	32,22	32,20	32,80	32,78	32,35
	Laboratório B	33,02	32,93	32,93	32,93	32,99	32,85	33,04
	Laboratório C	33,64	33,52	33,66	33,26	33,34	33,26	33,23
Dados estatísticos								
	M (g/100g)	$s_R$ (g/100g)	$CV_R$ (RSD <sub>R</sub> ) (%)	$S^2_R$	$R = 2,8 \times s_R$	$CV_{Horwitz}$ (%)	HorRat <sub>R</sub>	
Mortadela	11,99	0,553	4,61	0,306	1,549	2,75	1,7	
Farinha de soja	32,93	0,566	1,72	0,280	1,587	2,4	0,7	

*R1 a R7 = repetições independentes do ensaio para cada matriz; M = média;  $s_R$  = estimativa do desvio-padrão de reprodutibilidade;  $CV_R$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de reprodutibilidade; HorRat<sub>R</sub> = valor HorRat de reprodutibilidade;  $CV_{Horwitz}$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de reprodutibilidade previsto pela equação de Horwitz.*



Os índices de reprodutibilidade (R) para a precisão do laboratório quanto aos resultados de proteína para as matrizes mortadela e farinha de soja foram 1,549 e 1,587, respectivamente.

Para avaliar se a precisão quanto a reprodutibilidade era aceitável, utilizou-se o valor de HorRat, calculado com base na relação entre o coeficiente de variação obtido em condições de reprodutibilidade ( $cv_R$ ) e o coeficiente de variação predito por meio da equação de Horwitz ( $cv_{Horwitz} = 2^{1-0,5 \log c}$ , onde c é a concentração média de proteína na amostra). Se o valor HorRat for  $\leq 2,0$ , assume-se que a precisão do método quanto à reprodutibilidade é satisfatória (WOOD, 1999). Os valores HorRat obtidos foram 1,7 e 0,7 para mortadela e farinha de soja, respectivamente, portanto, os resultados das análises de proteína bruta para amostras de mortadela e farinha de soja foram considerados satisfatórios quanto à reprodutibilidade.

### **Exemplos para aplicação do índice de reprodutibilidade (R) na rotina do laboratório:**

**Proteína Bruta em amostra de mortadela:** dois laboratórios realizaram análises de proteína numa amostra de mortadela, em três replicatas. O laboratório A obteve valor médio de 13,5% e o laboratório B obteve o valor médio de 12,8%. Nesse caso, a diferença entre os resultados dos dois laboratórios foi de 0,7%, inferior ao valor de R (igual a 1,549%), portanto os dois resultados são válidos. Se o valor de R tivesse sido superior a 1,549%, haveria necessidade de se reanalisar a amostra de se compararem novamente os resultados.

**Proteína Bruta em amostra de farinha de soja:** dois laboratórios realizaram análises de proteína em uma amostra de farinha de soja, em três replicatas. O laboratório A obteve valor médio de 31,2% e o laboratório B o valor médio de 32,2%. Nesse caso, a diferença entre os resultados dos dois laboratórios foi de 1,1%, inferior ao valor de R (igual a 1,587%), portanto os dois resultados são válidos.

## **4.3 Avaliação da exatidão do método**

De acordo com o VIM (2012), exatidão é o grau de concordância entre um valor medido ( $x_i$ ) e um valor verdadeiro ( $x_v$ ) de um mensurando. Entre os procedimentos para se avaliar a exatidão de um método, estão: erro relativo; índice z; erro normalizado; recuperação.

**Erro Relativo (ER):** o erro relativo é estimado pela razão entre o erro absoluto ( $x_i - x_v$ ) e o valor verdadeiro ( $x_v$ ); geralmente representado em porcentagem conforme a equação:

$$ER = \frac{|x_i - x_v|}{x_v} \times 100$$

**Índice z (z):** o índice z é calculado com base na diferença entre o valor medido e o valor verdadeiro, padronizado num desvio-padrão, conforme a equação abaixo. Esse índice é interpretado com o número de desvios-padrão, envolvido na distância entre o valor medido e o valor verdadeiro, ou seja, é a diferença em unidades de desvios - padrão, entre o valor medido e o valor verdadeiro. Para uma distribuição normal, valores de  $|z| \leq 2$  são de exatidão satisfatória ao nível de 95% de confiança;

$$Z = \frac{|X_i - X_v|}{S_v}$$

**Erro Normalizado ( $E_n$ ):** caso o laboratório calcule a incerteza do resultado ( $U_i$ ), é possível utilizar essa ferramenta para a avaliação da exatidão do método. O valor  $E_n$  é baseado na diferença entre o valor medido e o valor verdadeiro, dividido pela raiz quadrada das incertezas associadas ao valor medido e ao valor verdadeiro. São considerados aceitos valores de  $|E_n| \leq 1,0$ , conforme equação:

$$E_n = \frac{|X_i - X_v|}{\sqrt{U_i^2 + U_v^2}}$$

**Recuperação (R):** como fonte de orientação para avaliação do limite de recuperação é possível utilizar os valores de recuperação previstos na tabela descrita no documento da AOAC “*International Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods*”, onde para concentrações na faixa de 100% o limite de recuperação é entre 98-101%, concentrações na faixa de 10% o limite é entre 95-102% e para concentrações na faixa de 1% o limite é entre 92-105% (FAO. 2011).

Valores dos testes utilizados para a avaliação da exatidão do método de proteína em amostra de mortadela e de farinha de soja estão apresentados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1.**

Valores dos testes utilizados para a avaliação da exatidão do método de proteína em amostra de mortadela e de farinha de soja.

Parâmetros	$X_i$	$S_i$	$X_v$	$S_v$
Mortadela	11,96	0,63	12,21	0,52
Farinha de soja	32,43	1,56	31,55	1,26
Testes	ER	z	En	R
Mortadela	-2,05	-0,5	-0,3	98,0
Farinha de soja	2,79	0,7	0,4	102,8

## 5 Controle dos parâmetros críticos da análise / fontes de erro

As fontes de erro associadas à determinação de nitrogênio total para a quantificação de proteínas nos alimentos estão ligadas à variabilidade na recuperação de nitrogênio durante a análise, à presença de substâncias não proteicas (nitrogenadas inorgânicas e orgânicas) e ao fator de conversão de nitrogênio – proteína.

O resultado final da análise é dependente da qualidade de cada etapa do processo analítico. A análise de proteína Kjeldahl apresenta várias etapas as quais podem ser fontes de erro. As fontes de erros precisam ser identificadas minimizadas e/ou controladas por meio de controles externos e/ou corrigidos por medidas de controle analítico em cada etapa da análise, por ações corretivas e preventivas e, ainda, pela adoção de boas práticas de laboratório.

### 5.1 Controle na recuperação de nitrogênio na análise de proteína.

#### 5.1.1 Amostra: Composição, Preparo e Massa da Amostra.

O laboratório deve não só adotar procedimentos de recepção de amostras bem como assegurar a estabilidade, prevenindo possíveis deteriorações e alteração da composição das amostras.

As etapas requeridas no preparo da amostra para a análise de proteína Kjeldahl dependem de suas características físicas e químicas. A homogeneidade da amostra analítica é fator determinante do tamanho da amostra, do tipo de equipamento e da qualidade dos resultados. O grau de homogeneidade da

amostra depende de uma ou mais etapas; ex.: fragmentação/corte, moagem, homogeneização. O tamanho de partícula da amostra deve ser <1 mm.

Na pesagem da amostra, deve ser utilizada balança calibrada e usada de acordo com as especificações, bem como ser submetida a verificações periódicas segundo a NBR ISO/IEC 17025:2005 (**ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS**, 2005). As amostras para a análise de nitrogênio Kjeldahl devem ser pesadas numa balança analítica, com acurácia de 0,1 mg (PERSSON; WENNERHOLM; O'HALLORAN, 2008).

A massa necessária da amostra para a análise depende do seu grau de homogeneidade. Resultados exatos para amostras não homogêneas não podem ser obtidos utilizando-se pequenas quantidades de amostra. Quanto menor a massa de amostra utilizada na análise, maior deverá ser seu grau de homogeneidade. Para amostras homogêneas, a massa de amostra deve ser pesada para obter um volume final de titulação adequado, em torno de 10 - 20 mL. A amostra analítica deve preferencialmente conter 30 - 140 mg de nitrogênio (MOORE et al., 2010).

## 5.1.2 Controle analítico nas etapas da análise de nitrogênio Kjeldahl

### *Digestão da amostra*

O desempenho da etapa de digestão da amostra requer o uso de amostras-controle bem como a adoção de procedimentos para se verificar o desempenho do processo de digestão, conforme segue.

### *Amostra-Controle (Branco)*

Deve ser incluso em cada conjunto de amostras colocadas para digestão um controle (branco) com o objetivo de verificar a presença de contaminação dos reagentes utilizados ou vidraria.

Um reagente comumente recomendado na amostra-controle (branco) é a sacarose. Essa geralmente é usada no controle da digestão para obter o consumo de ácido pelas impurezas e/ou contaminações. O procedimento possibilitará a correta compensação do branco nos cálculos (LYNCH; BARBANO, 1999).

Para minimizar possíveis absorções de nitrogênio amoniacal ( $N-NH_3$ ) do ambiente de digestão, os laboratórios devem verificar periodicamente as capelas quanto à eficácia do sistema de exaustão por meio de medidas periódicas

da velocidade facial de ar (vazão) (ISO 17025; ANSI/ASHRAE 110, 1995), assim como ter eficiente sistema de limpeza dos frascos e um plano de manutenção regular do sistema de Kjeldahl.

### ***Tempo e temperatura de digestão***

A complexidade da digestão da amostra depende de sua composição; ex.: amostras cujas proteínas são abundantes em resíduos de histidina e triptofano geralmente requerem longas ou drásticas condições de digestão. Para aumentar a eficiência do processo de digestão, recomenda-se o uso de sais, como: sulfato de potássio, sulfato de sódio, tiosulfato de sódio e sulfato de potássio, para elevar o ponto de ebulição do ácido sulfúrico, reduzindo-se o tempo de digestão e o consumo de ácido (CECCHI, 2003; SÁEZ- PLAZA et al., 2013).

A digestão a altas temperaturas assegura a recuperação dos compostos de nitrogênio que não se decompõe no ponto de ebulição do ácido sulfúrico concentrado, e reduz o tempo requerido para a digestão completa de amostras. A adequação da relação ácido : sal durante a digestão, destina-se a produzir uma temperatura de digestão ao redor de 380°C. No caso de amostras com uma grande quantidade de sais inorgânicos ou sólidos que se dissolvem durante a digestão, a temperatura pode subir acima de 400°C e ocorrer perdas de nitrogênio pirolítico; aumenta-se a quantidade de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na mistura digestora para se manter o equilíbrio ácido/catalisador, evitando-se perda de nitrogênio. A temperatura de digestão deve ser medida/monitorada na mistura de digestão com o uso de termopares especiais revestidos com platina. A recuperação de nitrogênio deve estar na faixa de 99% a 101% para todas as posições do conjunto de digestão.

A relação utilizada de sal por volume de ácido sulfúrico depende das características físicas e químicas da amostra, do tipo de catalisador ou mistura de sais usados e do tipo de método Kjeldahl. Contudo deve ser observada, na adequação das quantidades de sal ou de ácido sulfúrico utilizados na mistura digestora, que a adição não deve resultar a solidificação da massa em digestão e/ou resultar em volume da mistura digestora > a 1/3 do volume do frasco de digestão (PERSSON; WENNERHOLM; O'HALLORAN, 2008).

É recomendável o uso de padrões primários de diferentes digestibilidades e em diferentes concentrações para se verificar a eficiência da recuperação de nitrogênio, ajustar o uso do catalisador à temperatura e ao tempo da digestão para atingir, pelo menos, 98% de recuperação. Os padrões de nitrogênio primários devem ser digeridos com cada conjunto de amostras e

apresentar conteúdo de nitrogênio conhecido, elevada pureza e facilidade de armazenamento (não higroscópicos). Os padrões recomendados são p-toluenossulfonato de amônio (PTSA - *ammonium p-toluensulfonic acid*), glicina (PTSA - *glycine*-PTSA), ácido nicotínico (PTSA - *nicotinic acid*-PTSA) (*Nitrogen Primary Standard*. Hach Company, Loveland, Colorado. Disponível em <<http://www.Hach.com>>. Acesso em: 06 abr. 2014), triptofano e lisina (na forma de lisina- hidrocloreto) (LYNCH; BARBANO, 1999; MOORE et al. 2010).

### **Destilação**

Na etapa de destilação, devem-se adotar procedimentos não só para reduzir perdas de nitrogênio bem como testar o desempenho da destilação.

Nesta etapa, a adição de vapor, a adição de hidróxido de sódio, o transporte e a coleta do N-NH<sub>3</sub> gerado durante o processo de destilação, o design da ampola, a temperatura de condensação e as características químicas da solução receptora requerem atenção (MOLLER, 2013). O nitrogênio amoniacal difunde-se no interior do frasco com solução de coleta ou receptora de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) com indicador; assim, ao iniciar a destilação, certifique-se de que a ponta do condensador esteja imersa na solução de ácido bórico.

A adição de vapor e o controle das condições ambientes são fundamentais para se evitar arraste de hidróxido de sódio no destilado e para se estabilizar a solução de ácido bórico; logo a destilação deve ser conduzida à temperatura  $\leq$  a 25°C. Ao conduzir a destilação, o volume de destilado recuperado/recolhido deve ser em de torno 3 vezes o volume de solução de ácido bórico inicialmente usado. A adição de um pouco de zinco granulado impede a instabilidade durante a destilação.

Os testes de perda de nitrogênio ajudam a identificar perdas de nitrogênio tanto na digestão quanto na etapa de destilação. As perdas de nitrogênio podem ser determinadas por meio do uso de sulfato de amônio padrão (> 99% puro) previamente seco em estufa a 100 °C overnight e pesado (0,1200 g em balança com 4 casas decimais) (LYNCH; BARBANO, 1999). O sulfato de amônio é adicionado de sacarose no frasco de digestão – para consumir o ácido sulfúrico, semelhante ao que ocorre na digestão da amostra. A adição de sacarose evita reação violenta quando é adicionado hidróxido de sódio, no caso da presença excessiva de ácido sulfúrico no final da digestão. Para avaliar as amostras, é recomendável ser realizado um branco simultaneamente, utilizando-se apenas sacarose - para verificar impurezas nitrogenadas na sacarose.

Cabe salientar que a baixa recuperação durante a digestão ainda pode estar associada ao aquecimento desigual em posições específicas do digestor, vazamentos da tubulação ou refrigeração inadequada durante a destilação. Antes da destilação, as amostras devem ser homogeneizadas e resfriadas até à temperatura ambiente.

### **Titulação**

A titulação deve ser realizada o mais rapidamente possível após a destilação. Ainda deve-se assegurar que a temperatura do destilado não exceda 25°C, para minimizar erros devido à volatilização de ácido bórico (ISO 1871:2009). A temperatura ambiente deve ser monitorada a fim de se evitar a instabilidade de soluções de borato ácido de amônio.

A solução titulante deve ter a concentração adequada para a quantidade de nitrogênio existente na massa da amostra inicial. Para amostras com baixos teores de nitrogênio, utiliza-se a concentração de 0,01 mol.L<sup>-1</sup> HCl, enquanto para aquelas com maiores teores de nitrogênio utiliza-se HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, de forma que o consumo de solução titulante esteja entre 10 e 20 mL (REMESP, 2014).

A expressão dos resultados de proteína bruta na amostra é calculada com a determinação do nitrogênio total pela seguinte equação (GALVANI; ELINEY, 2006):

$$N_{Total} = \frac{[(V_a - V_b) \times F \times 0,1 \times 0,014 \times 100]}{P_1}$$

onde:

N<sub>T</sub> = teor de nitrogênio total na amostra (%);

V<sub>a</sub> = volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra (mL);

V<sub>b</sub> = volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco (mL);

F = fator de correção para o ácido clorídrico 0,01 mol/L;

P<sub>1</sub> = massa da amostra (em gramas).

Cabe salientar que, para se obter resultados comparáveis, a expressão dos resultados em massa seca é fundamental; assim, a determinação do teor de umidade da amostra é essencial. O conteúdo de proteína, expresso como percentagem por massa, é obtido multiplicando-se o teor de nitrogênio obtido pelo fator conversão (F) (Tabela 4.2).

### 5.1.3 Presença de substâncias não proteicas (nitrogenadas inorgânicas e orgânicas)

A maior parte dos componentes orgânicos da matriz é oxidada durante a etapa da digestão no método de Kjeldahl. Compostos orgânicos nitrogenados em alimentos incluem proteína, aminoácidos livres, ácidos nucleicos, fosfolípidios e glicosídeos nitrogenados (MARIOTTI; TOMÉ; MIRANDA, 2008).

O método de Kjeldahl não é específico para nitrogênio proteico e também não tem um elevado grau de seletividade para o nitrogênio orgânico. A Proteína Bruta não distingue N proteico de N não proteico (NNP). O NNP é constituído por compostos de baixo peso molecular, como peptídeos, aminoácidos livres, ácidos nucleicos, nitratos, amidas, aminas e amônia, pode ser mensurado como nitrogênio remanescente após a precipitação da proteína com ácidos. A falta de especificidade do método de Kjeldahl para nitrogênio orgânico total pode introduzir erros na quantificação.

Por isso surgiram métodos para determinar a “Proteína Verdadeira” - por meio de precipitação, seguida de quantificação de nitrogênio total no precipitado - para a obtenção do teor de proteína. O método para a determinação da Proteína Verdadeira de Leite Fluido foi adotado no final de 1994, e utilizado em vários países (SÁEZ-PLAZA et. al.2013; AOAC, 1991).

### 5.1.4 Fator de Conversão de Nitrogênio – Proteína

O teor de proteína num alimento é estimado multiplicando-se o teor de nitrogênio por um fator de nitrogênio para proteína, normalmente fixado em 6,25. O fator assume que a proteína alimentar tem 16% de N, designado como “Proteína Bruta (PB)”, usada na avaliação de alimentos, porém não é um indicador de quantidade e qualidade proteicas (MARIOTTI; TOMÉ; MIRANDA, 2008; GREENFIELD; SOUTHGATE, 2003)

Uma vez que o método é tido como padrão e o fator de conversão de nitrogênio em proteína usado influi na exatidão dos resultados, fatores de conversão para diferentes matrizes têm sido determinados, conforme apresentado na Tabela 4.2.



**Tabela 4.2.**.....  
 Fator de Conversão de Nitrogênio em Proteína para o método de Kjeldahl

PRODUTOS	FATOR DE CONVERSÃO (F)
Amêndoas	5,18
Amendoim	5,46
Arroz	5,95
Avelã	5,3
Carne/produtos cárneos	6,25
Castanha-do-pará	5,46
Cevada/aveia	5,83
Coco	5,3
Farinhas de centeio e de trigo	5,83
Gelatina	5,55
Leite e produtos lácteos	6,38
Macarrão	5,7
Soja	6,25
Ovos (clara)	6,7
Ovos (gema)	6,62
Ovos inteiros	6,68
Pescado	6,25
Outros alimentos	6,25

..... Fonte: IAL (2008)

## 6 Considerações sobre análise de Kjeldahl em algumas matrizes de alimentos

Geralmente os laboratórios realizam a análise de Kjeldahl sobre tipos de diferentes amostras, porém não é prático otimizar o procedimento para cada tipo de amostra. O ideal seria ter à disposição um procedimento único robusto, aplicável a vários tipos de amostras. Contudo é pouco provável a obtenção de um método de digestão universal para as diferentes matrizes (ZORGATI; RUTLEDGE; FEINBERG, 2000). No texto abaixo, seguem algumas recomendações/orientações quanto ao preparo de amostras e análise de Kjeldahl em relação às diferentes características químicas e físicas das amostras.

## Composição química das amostras

Os alimentos ricos em proteínas são fáceis de dissolução, porém o tempo de digestão é longo. É relativamente simples quando o produto apresenta baixos ou nenhum teor de gordura ou triptofano (PERSSON; WENNERHOLM; O'HALLORAN, 2008). Entretanto, em amostras com baixo teor de nitrogênio, torna-se necessário o uso de grandes volumes de amostra ou massas, tais como bebidas, águas límpidas etc.

Na análise de legumes e frutas, os problemas estão relacionados principalmente com o preparo da amostra, ou seja, alta umidade e altos teores de fibra (PERSSON; WENNERHOLM; O'HALLORAN, 2008).

Em caso de amostras com elevado teor de gordura ou de óleo é necessário mais ácido para efetuar a completa digestão e para evitar perdas de nitrogênio ou o *caking*. O elevado teor de gordura ou óleo, em alguns tipos de amostras (carne, sementes oleaginosas), pode causar a formação de espuma durante a digestão, assim recomenda-se uso de antiespumante (PERSSON; WENNERHOLM; O'HALLORAN, 2008).

No caso de leite e produtos lácteos recomenda-se a consulta dos procedimentos analíticos da **International Dairy Federation (IDF)** <[www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.org)> e o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* publicado pela *American Public Health Association*. Disponível em <<http://ajph.aphapublications.org>>. Acesso em: 06 abr. 2014.

## Estado físico das amostras

Amostras de grãos, cereais e ração geralmente são moídos em moinho tipo *chopper* até a obtenção de um pó fino, com tamanho de partículas menores que 1 mm ou 20 mesh para a quantificação de proteínas. Contudo o teor de umidade e de óleo nos grãos de cereais e oleaginosas dificulta a moagem (PERSSON; WENNERHOLM; O'HALLORAN, 2008). Adicionalmente pode ocorrer perda de umidade durante o processo de moagem, logo é necessária a determinação simultânea de umidade a fim de se obter maior precisão na quantificação de proteína.

No preparo de amostras de queijos e alimentos congelados, dispositivos do tipo broca são utilizados para se obter um núcleo a partir deles. No caso do queijo, para se obter uma amostra representativa, a casca deve ser removida (ISO, 2008; AOAC, 2000).

No caso de carne e produtos cárneos, as amostras apresentam baixa homogeneidade, tornando-se necessário maior tamanho de amostra, de modo que sejam inclusos e representativos todos os componentes da amostra.

## 7 Conclusão

A fração proteica dos alimentos e de ingredientes proteicos pode variar quanto à composição devido a variações genéticas e a respostas metabólicas a condições de estresses bióticos e/ou abióticos entre espécies e dentro das espécies. Ainda, as condições de processamento, armazenamento e distribuição do alimento podem influenciar na determinação de proteína, uma vez que podem induzir a variações na qualidade e quantidade de proteína, especialmente quanto à distribuição do peso molecular - devido à hidrólise seguida de oxidação e/ou racemização de aminoácidos; a reações intra e intermolecular; à reação de Maillard e sulfitólise e, portanto, pode influenciar na condução do método analítico e na qualidade dos resultados obtidos.

Diante dos diversos fatores que podem influir na fração proteica dos alimentos e de ingredientes proteicos e da diversidade de fontes de erro nas várias etapas na análise de proteína Kjeldahl, torna-se necessária a adoção intensiva de ações corretivas e preventivas para a garantia da qualidade do resultado final da análise e, assim, atender os respectivos padrões de qualidade e identidade do produto - requisito básico para sua comercialização.

## 8 Referências

- , Tratados CE/Euratom. **Regulamento (CE) No 152/2009 da Comissão de 27 de janeiro de 2009**. Jornal Oficial da União Europeia, 26.02.2009. L 54/1
- ANSI/ASHRAE: 110 -1995. **Method of Testing Performance of Laboratory Fume Hoods**. 1995. ASHRAE, 1791. Tullie Circle, N.E. Atlanta, GA 30329
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. 15<sup>th</sup> ed. **Crude Protein in Meat: Block Digestion Method. (981.10)** Official Methods of Analysis. 1990. ed.
- AOAC -Association of Official Analytical Chemists. 15<sup>th</sup> ed. **Nitrogen (Total) in Milk. (991.20)** Official Methods of Analysis. 2nd supplement. 1991.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Nitrogen in Cheese (920.13) Official Methods of Analysis. 33.7.12. 2000. AOAC Int., Gaithersburg, MD. 2000.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT NBR ISO/IEC 17025: **Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração**. 2. ed. . Editora ABNT, 2005. 31 p.
- BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (BNDES), 2011. Commodities Agrícolas: evolução recente de preços. **Informativo Técnico SEAGRI**, n. 4, p. 1-16, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 20 de 21 de julho de 1999. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 jul. 1999, p.10.

- CECCHI, H. M. Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos. 2. ed, Campinas: Ed. da Unicamp, 2003. 208 p.
- FAO, 2011. Quality assurance for animal feed analysis laboratories. FAO Animal Production and Health Manual n.º 14. Rome.
- FLORENCE, E.; HARRIS, W. M.; MILNER, D. F. Replacement of mercury by copper as a Kjeldahl catalyst for the determination of the total nitrogen in cheese. **Analyst**, v. 110, p. 971 - 973, 1985.
- GALVANI, F.; ELINEY G. E. **Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta**, Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 09 p. (Circular Técnica Embrapa, 63).
- GREENFIELD, H.; SOUTHGATE, T. **Food Composition Data**. 2. ed. Rome. Organization of the United Nations: FAO, 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/008/y4705e/y4705e00.htm>> Acesso em 06 mar. 2014.
- HAWKES, C. **Rotulagem: Informação Nutricional e Alegações de Saúde: o Cenário Global das Regulamentações. Organização Mundial da Saúde – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2006. 116 p.**
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.p. 1020. Versão eletrônica.
- International Organization for Standardization (ISO) 1871: **Food and feed products: General guidelines for the determination of nitrogen by the Kjeldhal method**. 2nd ed. Geneve, 2009.
- International Organization for Standardization (ISO) 707/ International Dairy Federation (IDF) 50:2008, **Milk and milk products - Guidance on sampling**.
- KROTZ, L.; CICERCI, E.; GIAZZI, G. Protein determination in cereals and seeds. **Food Quality & Safety Magazine**, August/September, 2008.
- Disponível em: <[http://www.foodquality.com/AugustSeptember\\_2008](http://www.foodquality.com/AugustSeptember_2008)> Acesso em 06 mar. 2014.
- LYNCH, J. M.; BARBANO, D. M.. Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products. **Journal of AOAC International**, v. 82, p. 1389 – 1396, 1999.
- MARIOTTI, F., TOMÉ, D.; MIRAND, P. P. Converting nitrogen into protein—beyond 6.25 and Jones’ factors. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 177-184, 2008.
- MOLLER, J. **N based methods for the determination of protein**. FOSS Laboratory Conference .September, 16 - 17, 2013. Hillerød, Denmark. Disponível em: <<http://www.foss.dk>>. Acesso em 02 dez. 2014.
- MOORE, J. C. Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, 2010, p. 330 - 357.
- NITROGEN PRIMARY STANDARD. Loveland, Colorado. USA. **Hach Company**, 2014. Disponível em <<http://www.Hach.com>>, Acesso em: 06 abr. 2014.
- PERSSON, J. A.; WENNERHOLM, M.; O’HALLORAN, S. **Handbook for Kjeldahl digestion**. 4. ed. Hilleroed, Denmark: FOSS, 2008.
- PRICE, C. G. et al. Comparison of mercury and copper-based catalysts in the Kjeldahl determination of nitrogen in meat and meat products: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 77, p. 1542 – 1546, 1994.

**REMESP.** Rede Metrológica do Estado de São Paulo. In: Comitê Técnico de Química de Alimentos (CTQA) **Documento CTQA. 2014. Campinas, 2014.**

SÁEZ-PLAZA, P. et al. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part II. Sample preparation, working scale, instrumental finish, and quality control. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 43, p. 224 – 272, 2013.

VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia): **Conceitos fundamentais e gerais e termos associados.** Duque de Caxias, RJ: INMETRO, 2012. 94 p.

WILES, P.G.; GRAY, I.K.; KISSLING, R.C. Routine analysis of proteins by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. *Journal of AOAC International*, v. 81, 1998, p. 620 - 632.

WOOD, R. How to validate analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, v.18, 1999, p.624-632.

ZORGATI, W.; RUTLEDGE, D. N.; FEINBERG, M. H. The use of synthetic foods to optimize microwave-assisted digestion procedures. *Analysis*, v. 28, 2000, p. 245 – 252.

# Umidade

*Elaine Marra de Azevedo Mazon  
Merenice Roberto Sobrinho*

## 1 Introdução

A determinação da umidade é uma das medidas mais importantes utilizadas na análise de alimentos. A umidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição, e pode afetar a estocagem, a embalagem e o processamento do alimento. Geralmente a umidade representa a água contida no alimento, que pode ser classificada em: umidade de superfície, referente à água livre ou presente na superfície externa do alimento, facilmente evaporada, e a umidade adsorvida, referente à água ligada, encontrada no interior do alimento, sem combinar-se quimicamente com ele. (BRASIL, 2005)

Embora a determinação de umidade pareça um método simples, torna-se complexa em função da exatidão e precisão dos resultados. As dificuldades encontradas geralmente são: a separação incompleta da água do alimento, decomposição com formação de água além da original, perda das substâncias voláteis do alimento, as quais podem ser computadas como peso em água. A água que será efetivamente determinada vai depender do método analítico empregado, e somente a água livre é medida com certeza em todos os métodos. Por isso, o resultado da medida da umidade deve vir sempre acompanhado do método utilizado e das condições empregadas, como tempo e temperatura (CECCHI, 2003).

## 2 Métodos

Procedimentos para a determinação do teor de umidade especificados em normas alimentares geralmente envolvem métodos de secagem térmica. O material é aquecido cuidadosamente em condições especificadas e a perda de peso é tomada como uma medida do conteúdo de umidade da amostra. A determinação da umidade a partir da perda de peso por aquecimento necessariamente envolve uma escolha empírica do tipo de estufa, temperatura e duração da secagem. Assim, os valores obtidos para a umidade dependem das condições selecionadas cujo objetivo é obter resultados precisos e exatos. Métodos para a determinação de umidade podem ser divididos em: métodos por secagem, procedimentos de destilação, ensaios químicos e procedimentos físicos (POMERANZ; MELOAN, 1994).

Os principais métodos utilizados para a determinação de umidade (CECCHI, 2003) estão abaixo elencados.

### 2.1 Métodos por secagem

#### **Secagem direta por estufa**

A secagem por estufa baseia-se na remoção da água por aquecimento em que o ar quente é absorvido por uma camada muito fina do alimento, e então levado para o interior por condução. O aquecimento direto da amostra a 105° C é o processo mais usual. Amostras de alimentos que se decompõem ou iniciam transformações a esta temperatura, devem ser aquecidas em estufas a vácuo, onde se reduz a pressão e se mantém a temperatura a 70°C (BRASIL, 2005).

#### **Secagem por radiação infravermelha**

Este tipo de secagem é mais efetivo e envolve a penetração do calor no interior da amostra, o que encurta o tempo de secagem. Equipamentos por secagem infravermelha possuem uma balança que faz a leitura direta do conteúdo de umidade por diferença de peso.

#### **Secagem em fornos de micro-ondas**

Embora muito rápida, não é um método-padrão. Os principais mecanismos que ocorrem durante o aquecimento por micro-ondas são a rotação dipolar e

a polarização iônica. O micro-ondas aquece rapidamente e seletivamente as áreas com maior umidade, atingindo o ponto de ebulição da água.

### **Secagem em dessecador**

Utilizam - se compostos químicos nos dessecadores a baixa pressão. É um método lento à temperatura ambiente, porém o uso do vácuo e de temperatura de 50°C pode acelerar o processo.

## **2.2 Método por destilação**

O método por destilação é utilizado para grãos e condimentos por apresentarem grandes quantidades de matéria volátil. É um método demorado, porém tem a vantagem de proteger a amostra de reações de oxidação e de decomposição devido às altas temperaturas utilizadas na secagem direta.

## **2.3 Método químico com o emprego do reagente de Karl Fischer**

Esse método baseia-se na reação quantitativa da água com uma solução anidra de dióxido de enxofre e iodo, na presença de uma base orgânica (imidazol) em metanol que se adiciona aos íons hidrogênio formados (BRASIL, 2005).

# **3 Determinação da umidade em farinha de soja e mortadela por secagem em estufa.**

### **Proposta de procedimento analítico**

A determinação de umidade por secagem em estufa em farinha de soja e mortadela está esquematizada na Figura 5.1, conforme Método N° 32.2.09 da AOAC Internacional 18th (2005) e Métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2005). As etapas da determinação de umidade consistem em:

- a) pesar de 2 a 10g de amostra previamente preparada em cápsula de porcelana ou de metal previamente tarada em estufa (105°C) durante 2 horas e resfriada a temperatura ambiente em dessecador durante aproximadamente 30min;



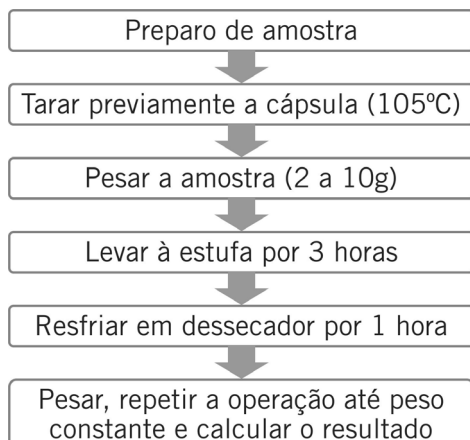
- b) levar à estufa a 105°C, por 3 horas;
- c) resfriar em dessecador durante 1 hora;
- d) pesar a cápsula com a amostra dessecada e anotar o valor;
- e) colocar na estufa por mais 1 hora;
- f) resfriar em dessecador durante 1 hora e pesar novamente;
- g) repetir a operação até obter peso constante;

cálculos:

$$\text{Umidade (\%)} = [(P - p) \times 100] / P$$

Onde: P = peso da amostra úmida e p = peso da amostra seca;

**Nota:** Denomina-se produto dessecado a fração de alimento privado de substâncias voláteis a 105°C (umidade).



**Figura 5.1.** ..... Fluxograma da marcha analítica para determinação de umidade em farinha de soja e mortadela

## 4 Resultados e Discussão

O desempenho do laboratório para as análises de umidade pelo método por secagem em estufa em farinha de soja e mortadela foi avaliado por meio da precisão e exatidão dos resultados, conforme Documento Orientativo DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2011) para ensaios de analitos na faixa de concentração entre 1% e 100%.

## 4.1 Precisão dos resultados

### Precisão quanto à Repetibilidade

A precisão foi determinada em condições de repetibilidade, ou seja, por meio de 7 determinações independentes realizadas pelo mesmo analista, utilizando o mesmo material e as mesmas condições de ensaio (reagentes e equipamentos). Os resultados obtidos para a análise de umidade estão apresentados no Quadro 5.1.

**Quadro 5.1.** .....  
 Resultados de umidade obtidos pelo método gravimétrico em farinha de soja e mortadela analisada em condições de repetibilidade.

Matriz	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
<b>Umidade (g/100g)</b>							
Farinha de soja	9,0	9,0	9,8	9,6	9,2	9,0	9,5
Mortadela	54,4	54,3	54,4	54,3	54,3	54,3	54,4
<b>Dados estatísticos</b>							
	$\bar{x}$ (g/100g)	$r = s_r$ (g/100g)	$CV_r$ (RSD <sub>r</sub> ) (%)	$s^2$	$r = 2,8 \times s_r$	$CV_{Horwitz}$ (%)	HorRat <sub>r</sub>
Farinha de soja	9,3	0,33	3,57	0,109	0,92	2,86	1,2
Mortadela	54,4	0,05	0,10	0,003	0,17	2,19	0,1

R1 a R7 = repetições independentes do ensaio para cada matriz; M = média;  $s_r$  = estimativa do desvio-padrão de repetibilidade;  $CV_r$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de repetibilidade; HorRat<sub>r</sub> = valor HorRat de repetibilidade;  $CV_{Horwitz}$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de repetibilidade predito pela equação de Horwitz.

O laboratório obteve índices de repetibilidade (r) para a análise de umidade em mortadela e farinha de soja de 0,17 e 0,92, respectivamente. Avaliando-se o coeficiente de variação da umidade para a farinha de soja, 3,57%, o valor encontrado está acima do recomendado pelo *Guideline for Single Laboratory* (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) de até 1% para ensaios do GRUPO 1 como é o caso do ensaio-umidade. Para a matriz mortadela, foi obtido um CV de 0,10, valor adequado.

Em seguida, foi avaliada se a precisão quanto à repetibilidade era aceitável, utilizando-se o valor de HorRat calculado com base na relação entre o coeficiente de variação obtido em condições de repetibilidade ( $cv_r$ ) e o coeficiente de variação predito por meio da equação de Horwitz ( $cv_{Horwitz} = 2^{1-0,5 \log c}$ , onde c é a concentração média de umidade na amostra). Se o valor HorRat

for  $\leq 2,0$ , assume-se que a precisão do método quanto à repetibilidade é satisfatória (WOOD, 1999). No exemplo, os valores HorRat obtidos foram 0,1 e 1,2 para mortadela e farinha de soja, respectivamente, e, portanto, os resultados das análises de umidade para amostras de mortadela e farinha de soja foram considerados satisfatórios quanto à repetibilidade.

## Precisão quanto à Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi determinada considerando-se uma comparação inter-laboratorial, ou seja, o teor de umidade nas amostras de mortadela e de farinha de soja foi determinado por três laboratórios diferentes (laboratório A, B e C). Cada laboratório realizou 7 determinações independentes, utilizando o mesmo método analítico. Os resultados estão apresentados no Quadro 5.2.

### Quadro 5.2

Teores de umidade para as amostras de mortadela e de farinha de soja analisadas em condições de reprodutibilidade (precisão intermediária).

Amostra		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
		Umidade (g/100g)						
Mortadela	Laboratório A	54,36	54,25	54,42	54,33	54,34	54,30	54,42
	Laboratório B	54,43	54,30	54,54	54,20	54,26	54,19	53,52
	Laboratório C	54,30	54,54	54,20	54,26	54,16	53,92	53,99
Farinha de soja	Laboratório A	9,01	9,03	9,77	9,61	9,23	9,04	9,46
	Laboratório B	9,17	9,06	8,98	9,10	9,17	9,30	9,22
	Laboratório C	9,13	8,99	9,23	9,03	9,25	9,05	9,21
Dados estatísticos								
	$\bar{X}$ (g/100g)	$s_R$ (g/100g)	$CV_R$ (RSD <sub>R</sub> ) (%)	$S^2_R$	$R = 2,8 \times$ $s_R$	$CV_{Horwitz}$ (%)	HorRat <sub>R</sub>	
Mortadela	54,25	0,22	0,41	0,047	0,62	2,19	0,2	
Farinha de soja	9,19	0,21	2,29	0,044	0,59	2,87	0,7	

R1 a R7 = repetições independentes do ensaio para cada matriz;  $M$  = média;  $s_R$  = estimativa do desvio-padrão de reprodutibilidade;  $CV_R$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de reprodutibilidade; HorRat<sub>R</sub> = valor HorRat de reprodutibilidade;  $CV_{Horwitz}$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de reprodutibilidade predito pela equação de Horwitz.

Os índices de reprodutibilidade (R) para a precisão do laboratório, quanto aos resultados de umidade para as matrizes mortadela e farinha de soja, foram 0,62 e 0,59, respectivamente.

Para avaliar se a precisão quanto à reprodutibilidade era aceitável, utilizou-se o valor de HorRat, calculado com base na relação entre o coeficiente de variação obtido em condições de reprodutibilidade ( $cv_R$ ) e o coeficiente de variação predito por meio da equação de Horwitz ( $cv_{Horwitz} = 2^{1-0,5 \log c}$ , onde  $c$  é a concentração média de umidade na amostra). Se o valor HorRat for  $\leq 2,0$ , assume-se que a precisão do método quanto à reprodutibilidade é satisfatória (WOOD, 1999). Os valores HorRat obtidos foram 0,2 e 0,7 para mortadela e farinha de soja, respectivamente, portanto, os resultados das análises de umidade para amostras de mortadela e farinha de soja foram considerados satisfatórios quanto à reprodutibilidade. Verificar no Capítulo 4 exemplos para a aplicação dos índices de repetibilidade e de reprodutibilidade (R) na rotina do laboratório.

## 4.2 Exatidão dos Resultados

Para se verificar a exatidão dos resultados, foi utilizado um material de referência (MRC) com valor certificado de:  $9,34 \pm 0,22\%$  (m/m) de umidade. Experimentalmente, o valor encontrado para o MRC (com sete repetições) foi de  $9,19 \pm 0,18\%$  (m/m) de umidade. Para se verificar a exatidão para os resultados da matriz Mortadela, foi utilizado um material de referência (MRC) com valor certificado de  $54,55 \pm 0,41\%$  (m/m) de umidade e experimentalmente o valor encontrado para o MRC (com sete repetições) foi de  $54,25 \pm 0,44\%$  (m/m) de umidade.

Conforme Tabela 5.1, os cálculos para a exatidão dos resultados para as matrizes farinha de soja e mortadela foram realizados por meio do erro relativo (ER); Índice Z e Erro normalizado (En) onde foram obtidos os valores de 1,60; 0,68 e - 0,53 respectivamente, para a farinha de soja. Para a matriz Mortadela, obtiveram-se os valores de - 0,54; 0,73 e - 0,50, respectivamente.

Na análise de umidade, nos cálculos para a exatidão dos resultados para as matrizes farinha de soja e mortadela não foram utilizados os testes de recuperação.

As dificuldades encontradas para a realização da recuperação podem ser mais bem compreendidas considerando-se a maneira em que água é en-

contrada nos vários componentes alimentares. A água pode ocorrer nos alimentos sob pelo menos três formas: uma certa quantidade está presente como água livre no espaço intergranular assim como no interior das partículas. Essa água preserva suas propriedades físicas usuais e serve como um agente de dispersão para as substâncias coloidais e como solvente para os compostos cristalinos. Parte da água encontra-se absorvida na superfície dos coloides macromoleculares (amidos, pectinas, celulose e proteínas). Essa água está intimamente associada às macromoléculas por forças de absorção, atribuídas às forças de Van der Waals ou a ligações de hidrogênio. Finalmente, uma parte da água está sob a forma ligada, em combinação com várias substâncias, isto é, como água de hidratação (POMERANZ; MELOAN, 1994). Dessa maneira fica descartada a realização de teste de recuperação uma vez que não é possível a contaminação intencional, pois toda água adicionada vai representar somente a forma livre.

**Tabela 5.1.**.....

Valores dos testes utilizados para a avaliação da exatidão do método de umidade em amostra de mortadela e de farinha de soja.

Parâmetros	$X_i$	$S_i$	$X_v$	$S_v$
Mortadela	54,25	0,44	54,55	0,41
Farinha de soja	9,34	0,22	9,19	0,18
Testes	ER	Z	En	
Mortadela	-0,54	0,73	-0,50	
Farinha de soja	1,63	0,68	-0,53	

## 5 Controle dos parâmetros críticos da análise / fontes de erro

Os métodos diretos de determinações de umidade estão sujeitos a grande variabilidade. Entre as principais variações estão: secagem incompleta; oxidação do material; erros de amostragem; erros de pesagem e erros de observação/analista.

As principais fontes de erros em relação à amostragem estão associadas à umidade do ambiente, à representatividade da amostra, às condições de armazenamento e à técnica de moagem/fragmentação da amostra. A técnica de moagem deve ser selecionada em função do tamanho da partícula/fração

requerida e das características químicas e físicas da matriz, uma vez que, durante essa etapa, pode haver alteração dos resultados, devido a reações promovidas por exposição a oxigênio e a umidade, por geração de calor e por contaminação física. Assim, as condições ambientais do método de fragmentação e/ou técnica de moagem são essenciais à representatividade da amostra; logo, para a qualidade dos resultados, especialmente no caso de alimentos sólidos incluindo: grãos, biscoitos, massas, produtos cárneos etc.

Para minimizar os erros de pesagem da amostra deve-se usar balança calibrada e de acordo com suas especificações. Ela, também, deve ser submetida a verificações periódicas segundo a NBR ISO/IEC 17025:2005 (**ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS**, 2005). Outro aspecto importante consiste em se evitar variação de temperatura da amostra pesada - amostras quentes provocam correntes de convecção alterando a precisão da balança.

Outro requisito importante para o bom desempenho do laboratório na determinação de umidade é o controle da estufa - a qual deve ser monitorada/verificada quanto à estabilidade da temperatura, uniformidade de aquecimento, a circulação de ar e a precisão do termômetro.

A adequação do tempo e temperatura de secagem em relação às características físicas e químicas da matriz (THIEX; RICHARDSON, 2003) é fundamental para a qualidade dos resultados de umidade, pois minimiza/elimina erros associados à secagem incompleta, a perdas de massa devido a reações de oxidação, carbonização e caramelização, à perda de voláteis, oxidação de lipídios, à separação incompleta da água, à decomposição com formação de água. Cabe salientar que, quando há risco de decomposição em função da temperatura, recomenda-se o uso de estufa a vácuo que permite a redução da temperatura de aquecimento (GARCIA – AMOEDO; ALMEIDA - MURADIAN, 2002).

## Considerações sobre o preparo de amostra e características de algumas matrizes de alimentos para análise de umidade

### Preparo de amostra

A maioria dos alimentos são relativamente heterogêneos na sua natureza. É importante garantir que a amostragem seja verdadeiramente representativa do produto a ser analisado. O método de amostragem está relacionado com a natureza do alimento e deve seguir as orientações aqui indicadas:

- em geral, alimentos secos devem ser processados em pó por meio de um moinho mecânico;
- alimentos sólidos úmidos devem ser homogeneizados usando-se equipamento como processador doméstico para alimentos; alimentos muito úmidos, como leites, devem ser colocados em banho-maria até que o excesso de água evapore. Cuidados devem ser tomados para evitar a separação de gordura com emulsões, tais como creme de saladas e sopas-creme;
- óleos e gorduras: devem ser aquecidos e filtrados. A temperatura não deve ser excessiva para evitar eventuais perdas de antioxidantes presentes;
- emulsões de gordura: alimentos como manteiga ou margarina devem ser aquecidos a 35°C, em vidraria própria com tampa, e agitado.

Uma vez preparadas, amostras de alimentos devem ser transferidas tão rapidamente quanto possível para recipientes secos, de plástico rígido ou de vidro e selado para evitar perda ou ganho de umidade, e, em seguida, claramente rotulados e armazenados num ambiente frio (JAMES, 1996).

## **Características de algumas matrizes de alimentos**

Para produtos lácteos e cárneos, cuja evaporação por um tempo fixo possa resultar na remoção incompleta da água e formação de uma crosta que dificulta a evaporação, é recomendada a homogeneização com areia tratada (JAMES, 1996).

Para amostras muito úmidas, como leite, pode-se utilizar banho-maria até que o excesso de água seja evaporado (JAMES, 1996).

Em alimentos com altos teores de açúcar ou aqueles que se decompõem ou iniciam transformações a 105°C deve ser utilizado vácuo com redução da temperatura para se evitarem transformações indesejáveis (CARVALHO, 2002).

Uma vez conhecidas as prováveis fontes de erro associadas à determinação de umidade nos alimentos, o laboratório, para assegurar a qualidade dos resultados, deve adotar medidas corretivas/preventivas para minimizar a ocorrência de erros.

## 6 Conclusão

A determinação da umidade é uma das medidas mais importantes utilizadas na análise de alimentos. Relaciona-se com sua estabilidade, qualidade e composição e pode afetar as características do produto na estocagem (deteriorações físicas, químicas e microbiológicas) na embalagem (reações de escurecimento enzimático e não enzimáticas incluindo vegetais, frutas desidratadas, ovo em pó etc.) e no processamento (como a umidade do trigo na fabricação do pão e produtos de padaria). Além disso, para fins de rotulagem, influi na exatidão e precisão das determinações de todos os outros componentes dos alimentos.

Logo, para a determinação de umidade, são requisitos essenciais ao bom desempenho analítico do laboratório: a escolha adequada do método para a determinação da faixa de umidade esperada considerando-se a natureza da amostra, a forma pela qual a água está presente (livre ou ligada) e a exatidão e a precisão necessárias ao uso pretendido do resultado. Ainda devem ser associadas, sempre que possível, ao controle as prováveis fontes de erros na determinação.

## 7 Referências

**ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT)**, NBR ISO/IEC 17025:2005 - **Requisitos Gerais para competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração** - outubro/2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC**. 18th ed., Washington (DC), 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4.ed. Brasília, 2005. 1018p.

CARVALHO, H.H. et al. **Alimentos: Métodos Físicos e Químicos de Análise**. 1ª Ed., Porto Alegre: Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002 p. 170.

CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. 2. ed, Campinas: Ed. da Unicamp, 2003. 208 p.

FERNANDES, M.J.E. et al. Determinação do teor de umidade em salsicha tipo Frankfurt utilizando microondas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 563-564, 2007.

GARCIA – AMOEDO, L. H.; ALMEIDA - MURADIAN, L. B. Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geleia real. **Química Nova**, v. 25, p. 676-679, 2002.



INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2005, 1018p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMATIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. INMETRO DOQ-CGCRE - 008:2011. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos – Documento de Caráter Orientativo**. REVISÃO 4. Rio de Janeiro, julho de 2011.

JAMES, C.S. Experimental procedures – Estimation of major food constituents. **Analytical Chemistry of Foods**. p. 72-74, 1996.

POMERANZ, Y.; MELOAN, C. E. **Food Analysis Theory and Practice**. Third Edition, New York: Ed. Chapman & Hall, 1994, p.575 a 581.

THIEX, N.; RICHARDSON, C. R. Challenges in measuring moisture content of feeds. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 3255 - 3266, 2003.

THOMPSON, M., ELLISON, S. L. R., WOOD R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, IUPAC Technical report, **Pure and Applied Chemistry**, v.74, p. 835-855, 2002.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, p.624-632, 1999.

# CINZAS

*Ana Lúcia de Matheus e Silva  
Carla Ivone Carraro  
Mary Ângela Fávoro Perez*

## 1 Introdução

A composição das cinzas consiste basicamente dos macroelementos (principalmente Ca, K, Mg, Na) e microelementos (Al, Cu, Fe, Mn, Zn), porém sua composição depende da natureza do alimento e do método usado na determinação.

A determinação de cinzas é importante principalmente para: a rotulagem nutricional, a fortificação de alimentos e a identificação da presença de alguns contaminantes inorgânicos. Ainda pode ser usada como indicativo de pureza e de adulteração de alguns alimentos incluindo índice de refinação de açúcares e farinhas, classificação de farinha de trigo etc. (CECCHI, 2003).

A cinza consiste no resíduo inorgânico remanescente após a completa destruição da matriz orgânica do alimento, ou por incineração e / ou presença de agentes oxidantes, a qual é transformada em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e NO<sub>2</sub>. Cabe salientar que, a determinação dos minerais e de alguns contaminantes inorgânicos dos alimentos pode ser realizada por meio da determinação de cinzas e com a sucessiva quantificação dos elementos individuais com equipamento de espectrofotometria óptica (NUNES DA SILVA, 2012).

Em geral, o conteúdo de cinzas nos alimentos de origem animal geralmente é constante enquanto os alimentos de origem vegetal tendem a ter um conteúdo de cinzas bastante variado. Neste trabalho, serão verificadas a precisão e a exatidão dos resultados obtidos para cinzas em 2 matrizes: um vegetal (farinha de soja) e outra animal (mortadela).

## 2 Métodos de determinação das cinzas

A escolha do método de determinação das cinzas bem como o controle dos parâmetros críticos na análise, são essenciais para a qualidade dos resultados. Segundo Nunes da Silva (2012) a determinação das cinzas pode ser obtida por meio de três métodos: cinzas secas, cinzas úmidas e cinzas secas a baixas temperaturas.

### Cinzas Secas

Esse método consiste em incinerar a amostra em mufla em temperatura entre 550°C e 570°C, promovendo a evaporação da água e de substâncias voláteis e a oxidação da matéria orgânica.

### Cinzas Úmidas

É uma técnica mais adequada para alimentos com alto teor de gordura na qual se utilizam ácidos concentrados em alta temperatura para provocar a destruição da fração orgânica da amostra. Também é utilizada na determinação de elementos-traços que podem ser perdidos na determinação por meio do método das cinzas secas.

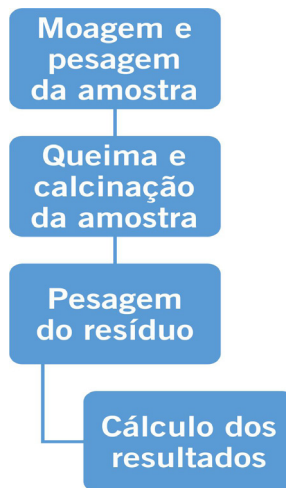
### Cinzas Secas a Baixas Temperaturas

Este método tem como característica preservar o material volátil da amostra. Empregam-se sofisticados equipamentos que permitem a geração de plasma de oxigênio, material altamente oxidante capaz de destruir toda a fração orgânica da amostra.

## 3 Determinação de cinzas em farinha de soja e mortadela

### Proposta de procedimento analítico

A determinação de cinzas para as matrizes mortadela e farinha de soja deu-se segundo AOAC *Official Method 920.153 - Ash of meat and meat products* e AOAC *Official Method 923.03 - Ash of flour and relevant products, biscuit*, respectivamente. As etapas da determinação estão apresentadas na Figura 6.1.



**Figura 6.1.** ..... Fluxograma de determinação de cinzas nas duas matrizes.

## 4 Resultados e Discussão

O desempenho do laboratório para análise de cinzas em farinha de soja e mortadela foi avaliado por meio da precisão e exatidão dos resultados.

### 4.1 Precisão: repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados

A avaliação da precisão da análise de cinzas em farinha de soja e mortadela quanto à repetibilidade foi determinada por 7 medições independentes realizadas pelo mesmo analista, utilizando-se o mesmo material e as mes-

mas condições de ensaio. A reprodutibilidade foi determinada em termos de comparação interlaboratorial, ou seja, o teor de cinzas nas amostras de mortadela e de farinha de soja foi determinado por três laboratórios diferentes (laboratório A, B e C); cada laboratório realizou 7 determinações independentes, em condições de reprodutibilidade; dessa forma, a variável foi quem realizou as análises (o laboratório). A análise estatística da repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados de cinzas em farinha de soja e em mortadela estão apresentados nos Quadros 6.1 e 6.2, respectivamente.

### Quadro 6.1

Repetibilidade para os resultados de cinzas em farinha de soja e mortadela.

Matriz	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
<b>Cinzas (g/100g)</b>							
<b>Farinha de soja</b>	4,51	4,30	4,50	4,47	4,48	4,50	4,51
<b>Mortadela</b>	4,25	3,85	4,10	3,85	4,20	3,85	3,90
<b>Dados estatísticos</b>							
	$\bar{x}$ (g/100g)	$r = s_r$ (g/100g)	$CV_r$ (RSD <sub>r</sub> ) (%)	$s^2$	$r = 2,8 \times \frac{s_r}{\bar{x}}$	$CV_{Horwitz}$ (%)	HorRat <sub>r</sub>
<b>Farinha de soja</b>	4,47	0,08	1,72	0,0064	0,21	3,19	0,5
<b>Mortadela</b>	4,00	0,18	4,45	0,0324	0,50	3,25	1,4

R1 a R7 = repetições independentes do ensaio para cada matriz;  $M$  = média;  $s_r$  = estimativa do desvio-padrão de repetibilidade;  $CV_r$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de repetibilidade; HorRat<sub>r</sub> = valor HorRat de repetibilidade;  $CV_{Horwitz}$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de repetibilidade predito pela equação de Horwitz.

O laboratório obteve índices de repetibilidade ( $r$ ) para a análise de cinzas em mortadela e farinha de soja de 0,50% e 0,21%, respectivamente. Em seguida, foi avaliado se a precisão quanto à repetibilidade era aceitável, utilizando-se o valor de HorRat o qual é calculado com base na relação entre o coeficiente de variação obtido em condições de repetibilidade ( $CV_r$ ) e o coeficiente de variação predito por meio da equação de Horwitz ( $CV_{Horwitz} = 2^{1-0,5 \log c}$ , onde  $c$  é a concentração média de cinzas na amostra). Se o valor HorRat for  $\geq 2,0$ , assume-se que a precisão do método quanto à repetibilidade é satisfatória (WOOD, 1999). No exemplo, os valores HorRat obtidos foram 1,4 e 0,5 para mortadela e farinha de soja, respectivamente e, portanto, os resultados das análises de cinzas para amostras de mortadela e farinha de soja foram considerados satisfatórios quanto à repetibilidade.

**Quadro 6.2.**.....  
Reprodutibilidade para os resultados de cinzas em farinha de soja e mortadela.

Amostra		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
		Cinzas (g/100g)						
Mortadela	Laboratório A	4,25	3,85	4,10	3,85	4,20	3,85	3,90
	Laboratório B	4,20	4,25	4,00	3,85	4,15	3,90	3,80
	Laboratório C	3,90	4,20	4,20	4,00	3,85	4,30	4,10
Farinha de soja	Laboratório A	4,54	4,30	4,56	4,39	4,48	4,49	4,55
	Laboratório B	4,45	4,75	4,60	4,46	4,40	4,38	4,52
	Laboratório C	4,46	4,36	4,56	4,44	4,45	4,44	4,50
Dados estatísticos								
	$\bar{x}$ (g/100g)	$s_R$ (g/100g)	$CV_R$ (RSD <sub>R</sub> ) (%)	$S^2_R$	$R = 2,8 \times s_R$	$CV_{Horwitz}$ (%)	HorRat <sub>R</sub>	
Mortadela	4,03	0,17	4,22	0,03	0,48	3,25	1,31	
Farinha de soja	4,48	0,10	2,23	0,01	0,28	3,19	0,7	

*R1 a R7 = repetições independentes do ensaio para cada matriz; M = média;  $s_R$  = estimativa do desvio-padrão de reprodutibilidade;  $CV_R$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de reprodutibilidade; HorRat<sub>R</sub> = valor HorRat de reprodutibilidade;  $CV_{Horwitz}$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de reprodutibilidade predito pela equação de Horwitz.*

Os índices de reprodutibilidade (R), por sua vez, para a precisão do laboratório quanto aos resultados de cinzas para as matrizes mortadela e farinha de soja foram 0,48 e 0,28, respectivamente.

Para avaliar se a precisão quanto à reprodutibilidade era aceitável, utilizou-se o valor de HorRat, o qual é calculado com base na relação entre o coeficiente de variação obtido em condições de reprodutibilidade ( $CV_R$ ) e o coeficiente de variação predito por meio da equação de Horwitz ( $CV_{Horwitz} = 2^{1-0,5 \log c}$ , onde c é a concentração média de cinzas na amostra). Se o valor HorRat for  $\geq 2,0$ , assume-se que a precisão do método quanto à reprodutibilidade é satisfatória (WOOD, 1999). Os valores HorRat obtidos foram 1,3 e 0,7 para mortadela e farinha de soja, respectivamente, e, portanto, os resultados das análises de cinzas para amostras de mortadela e farinha de soja foram considerados satisfatórios quanto à reprodutibilidade. No Capítulo, 4 apresentam-se exemplos para a aplicação dos índices de repetibilidade e de reprodutibilidade (R) na rotina do laboratório.

## 4.2 Exatidão dos Resultados

Para avaliar a exatidão do método de cinzas para a matriz farinha de soja foi utilizado um material de referência (MRC) com valor certificado de:  $4,49 \pm 0,06\%$  (m/m) de cinzas. Experimentalmente, o valor encontrado para o MRC (com sete repetições) foi de  $4,51 \pm 0,13\%$  (m/m) para cinzas. Para verificar a exatidão para mortadela foi utilizado material de referência (MRC) com valor certificado de  $4,00 \pm 0,18\%$  (m/m) de cinzas, enquanto o valor encontrado experimentalmente para o MRC (com sete repetições) foi de  $4,02 \pm 0,18\%$  (m/m) de cinzas.

Os procedimentos na avaliação da exatidão dos resultados de cinzas para a matriz farinha de soja e mortadela foram realizados por meio do erro relativo (ER); Índice Z; Erro normalizado (En) e Recuperação (Rec) e estão apresentados na Tabela 6.1.

**Tabela 6.1**.....  
Valores dos testes utilizados para a avaliação da exatidão do método de cinzas em amostra de mortadela e de farinha de soja.

Parâmetros	$X_i$	$S_i$	$X_v$	$S_v$
Mortadela	4,02	0,18	4,00	0,18
Farinha de soja	4,51	0,13	4,49	0,06
Testes	ER	z	En	Rec
Mortadela	0,54	0,1	0,1	100,5
Farinha de soja	0,45	0,3	0,1	100,4

## 5 Controle dos parâmetros críticos da análise / fontes de erro

Com base nos resultados de cinzas para as matrizes farinha de soja e mortadela, concluímos que a obtenção de bom desempenho analítico do laboratório para a análise de cinzas depende da adoção de boas práticas de laboratório bem como do controle dos parâmetros críticos da análise / fontes de erro como segue.

## Analista

É essencial o treinamento dos analistas na execução da análise de cinzas nas diferentes matrizes, bem como no uso dos equipamentos utilizados no decorrer de todo o processo analítico.

## Manipulação da amostra e procedimentos durante as pesagens

Deve-se tomar todo o cuidado no manuseio do cadinho com a cinza antes da pesagem, pois, por tratar-se de material de baixa densidade, pode ocorrer perda. Recomenda-se cobrir o cadinho com um vidro de relógio, mesmo quando estiver no dessecador. Algumas cinzas são muito higroscópicas, especialmente aquelas que contêm carbonato de potássio; logo devem ser pesadas o mais rapidamente possível num frasco com tampa (pesa-filtro).

## Tempo e Temperatura de incineração

Os elementos minerais podem estar presentes na cinza sob a forma de óxidos, sulfatos, fosfatos, silicatos e cloretos. Durante o processo analítico, dependendo das condições de pré e de incineração, e da composição do alimento, podem ocorrer perdas por: arraste, volatilização, interação entre os constituintes da amostra, transformações - por exemplo, de oxalatos de cálcio em carbonatos ou até em óxido.

Assim, os resultados obtidos de cinza de uma amostra de alimento (matriz) podem não ter necessariamente a mesma composição em relação ao teor de mineral originalmente presente no alimento. Para melhorar a qualidade dos resultados de cinzas, é necessário adequar às condições de incineração as características físicas e químicas da amostra (IAL, 2008). Nesse contexto, seguem alguns procedimentos para algumas matrizes:

- amostras líquidas e úmidas devem ser secas antes de se incinerar;
- produtos com grande quantidade de matéria volátil devem ser aquecidos vagarosamente;
- matrizes ricas em gordura devem ser aquecidas cuidadosamente para se evitar excesso de chama que poderia causar perdas por arraste e, ainda, a adição de oxidantes como *peridrol*. Por exemplo, para margarina: primeiramente coloca-se a amostra em estufa por 6 horas a 100°C e, depois, em forno mufla a 100°C. Em seguida, aumenta-se a temperatura gradualmente - de 50°C em 50°C a cada 1 hora até atingir a temperatura de 550°C.



Há outros procedimentos para produtos com muita gordura como a manteiga, em que é necessário fazer a extração da gordura da amostra já seca com algum solvente orgânico, como éter etílico ou éter de petróleo, antes da incineração da amostra.

Em peixes e produtos marinhos gordurosos, deve-se fazer uma incineração prévia a baixa temperatura de modo que a gordura comece a fumer sem incendiar-se. Em caso de queijos gordurosos deve-se adicionar pequena quantidade de algodão absorvente (com quantidade de cinza conhecida) e incinerar cuidadosamente para evitar respingos fora do cadinho.

Os produtos açucarados tendem a formar espuma durante a determinação de cinzas. Isso pode ser evitado adicionando-se vaselina ou azeite de oliva em pequena quantidade. Nos métodos oficiais, recomenda-se que açúcares e produtos açucarados devem ser secos a 100°C, em banho-maria ou em estufa; em seguida, adicionar pequenas gotas de azeite puro (isento de elementos minerais) para, então, o produto ser aquecido vagarosamente.

Cabe ainda salientar que alguns minerais podem ser perdidos por volatilização, impossibilitando a posterior quantificação dos elementos individuais nas cinzas. Logo os valores da temperatura a ser utilizada e sua faixa de variação no processo analítico devem ser adequados para estabilizar o elemento que se quer determinar, ou seja, que não sejam volatilizados ou perdidos durante a calcinação. Na Tabela 6.2 apresenta-se a temperatura de volatilização de alguns minerais (CECCHI, 2003).

**Tabela 6.2.**.....  
Tipos de minerais que podem ser perdidos por volatilização em função da temperatura usada na calcinação.

Composto	Temperatura de volatilização
Carbonato de potássio	900°C
Carbonato de sódio	900°C
Hg	100°C - 550°C
Cd	>450°C
Zn e Pb	300°C - 1000°C

Para assegurar o trabalho na faixa de temperatura do ensaio, é importante a calibração do termopar da mufla, no qual se obtém a relação entre os valores (em mV) indicados pelo termopar e os valores correspondentes das temperaturas estabelecidos por um padrão.

Outro aspecto muito importante é a uniformidade da distribuição de calor no interior da mufla. Recomenda-se verificar a uniformidade da distribuição de calor por meio da queima de cadinhos com carbonato de cálcio. O procedimento consiste na pesagem de 1 g de carbonato de cálcio p.a, previamente seco em estufa (3 horas por 105°C), no cadinho ou cápsula e proceder à calcinação como nas demais amostras; utiliza-se esse procedimento simultaneamente em vários pontos no interior da mufla. A faixa aceitável deve ser de 95 - 100,5% dependendo da qualidade do carbonato de cálcio utilizado. Com esse monitoramento, pode-se verificar a estabilidade térmica da mufla e minimizar a variabilidade de resultados no laboratório (REMESP, 2014).

## Pesagem

Para minimizar a probabilidade de erros de pesagem na análise de cinzas, é necessária a calibração da balança usada bem como a realização verificação intermediária com uso de massa-padrão na faixa de trabalho do ensaio.

## 6 Conclusão

O ensaio de cinzas é gravimétrico e os resultados analíticos dependem diretamente da calibração adequada dos equipamentos quanto à massa e temperatura e boas práticas laboratoriais na condução do ensaio. O tipo de matriz deve ser levado em consideração, para que não ocorram perdas nas fases de pré-queima e calcinação das amostras.

## 7 Referências

AOAC INTERNATIONAL. **Ash of flour – direct method**. In: Official Methods of AOAC International, method 923.3 (23.01.05).

AOAC INTERNATIONAL. **Ash of meat – direct method**. In: Official Methods of AOAC International, method 920.153 (39.1.09).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020.

CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. 2.ed., Campinas: Ed. da Unicamp, 2003. 208 p.

NUNES DA SILVA, V. S. **Métodos para determinação de Cinzas em Alimentos**. Centro de Ciência e Qualidade dos Alimentos. Instituto de Tecnologia de Alimentos. APTA/SAA. 2012.

**REMESP.** REDE Metrológica do Estado de São Paulo. In: Comitê Técnico de Química de Alimentos (CTQA) **Documento CTQA. 2014. Campinas, 2014.**

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, p.624-632, 1999.

# GORDURA TOTAL

*Elza T. Grael Marasca  
Márcia Regina Cucatti Alves  
Valquíria T. D'Almeida*

## 1 Introdução

As gorduras são fundamentais para o sabor e textura do alimento, melhorando suas características sensoriais. Adicionalmente, criam uma sensação de saciedade durante mais tempo. Além de serem essenciais, como fonte de energia e de substâncias bioativas, lipossolúveis, incluindo as vitaminas A, D, E K, desempenham funções estruturais como parte das membranas celulares. As gorduras dos alimentos consistem em misturas de substâncias as quais têm como característica comum a insolubilidade em água e compreendem três classes de substâncias importantes na alimentação: os fosfolipídios, o colesterol e os triglicérides (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

A busca por alimentos mais nutritivos e saudáveis por significativa parcela da população tem demandado pesquisas sobre diversos ácidos graxos, em particular os ácidos essenciais e os isômeros do ácido linoleico conjugados (CLA) com atividade biológica. Contudo o consumo de gordura saturada está associado ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo máximo de 10% do total de calorias obtidas com gorduras saturadas, sem que haja risco para a saúde (BRASIL, 2005).

Estudos realizados por Prado e colaboradores (2013) em alimentos processados demonstraram que 62% apresentaram diferença considerável para gordura total, 43% maior em rótulos de alimentos comercializados e, nas amostras avaliadas, os lipídios apresentaram 9,58% acima do recomendado.

Diante não apenas da atual dinâmica do mercado de alimentos, com inserção, retirada e alterações na formulação, como também da importância dos lipídios para a nutrição humana, há uma demanda contínua por novos métodos visando à adequação e ao controle de qualidade analítica para a obtenção de resultados de qualidade para o atendimento da Legislação e o fornecimento de informações fidedignas quanto à composição, qualidade, quantidade na rotulagem dos produtos.

## 2 Método de Soxhlet

Os teores de lipídios totais no alimento variam consideravelmente com o método analítico. Embora seja de importância nutricional limitada, a determinação é amplamente usada no controle de qualidade dos alimentos. No que tange o aspecto nutricional, é crescente a importância da avaliação quantitativa quanto à composição de triacilgliceróis, esteróis, fosfolipídios e ácidos graxos. Nesse contexto, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial Saúde recomendam que os resultados sobre a composição lipídica dos alimentos estejam disponíveis para o consumidor e que sejam obtidos com base em métodos padronizados com materiais de referência (CHRISTIE, 2003).

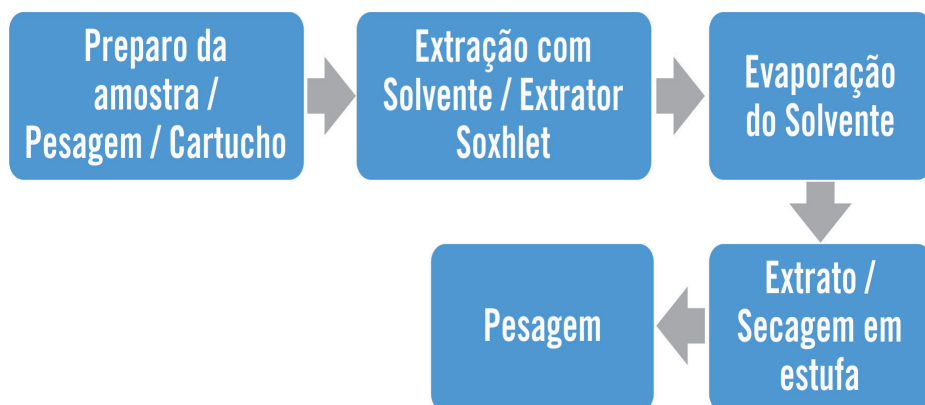
Na análise da composição centesimal, a gordura corresponde à fração do alimento solúvel em solventes orgânicos e inclui diferentes classes de substâncias. O método clássico de determinação de lipídios baseia-se na extração contínua em amostras secas de alimentos com extrator Soxhlet, às vezes precedida por hidrólise alcalina ou ácida.

Para a determinação do teor de gordura total em farinha de soja e mortadela, utilizou-se o método de Soxhlet. Esse método fundamenta-se na solubilidade dos lipídios em solventes apropriados (éter de petróleo ou n-hexano ou éter etílico anidro) e tem como características: o refluxo do solvente no extrator, o uso de amostra sólida e a amostra sem contato direto com o solvente em ebulição (CECCHI, 2003).

A técnica consiste em colocar a amostra previamente triturada/fragmentada e homogeneizada dentro de um cartucho, o qual é pesado e colocado no interior da cápsula de extração. O solvente é aquecido, o vapor liberado passa por um condensador e circula dentro da cápsula que contém a amostra, extraíndo os compostos solúveis presentes. Após vários ciclos, obtém-se o extrato solubilizado no solvente; em seguida, o solvente é evaporado e o extrato final levado à estufa com circulação e renovação de ar até peso constante.

## Proposta de procedimento analítico

O teor de gordura total foi determinado por gravimetria conforme fluxograma apresentado na Figura 7.1. A determinação de gordura em farinha de soja foi realizada segundo o IAL (2008) e em mortadela foi realizada segundo a Instrução Normativa n.º 20 (Brasil, 1999).



**Figura 7.1.** .....  
Fluxograma de determinação de gordura total nas duas matrizes.

## 3 Resultados e Discussão

O desempenho do laboratório para a análise de gordura total em farinha de soja e mortadela foi avaliado não apenas por meio da precisão, quanto à repetibilidade e reprodutibilidade, como também pela exatidão dos resultados.

### 3.1 Precisão: repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados

#### Repetibilidade dos resultados

A avaliação da precisão da análise de gordura em farinha de soja e mortadela quanto à repetibilidade foi determinada com 7 medições independentes realizadas pelo mesmo analista, utilizando-se o mesmo material e as mesmas condições de ensaio. Os resultados obtidos para a análise de gordura total estão apresentados no Quadro 7.1.

**Quadro 7.1.**.....  
Repetibilidade para os resultados de gordura total em farinha de soja e mortadela.

Matriz	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	Gordura Total (g/100g)						
Farinha de soja	22,02	20,75	22,18	22,47	22,49	21,72	22,21
Mortadela	15,8	15,2	14,3	15,8	14,5	14,3	14,7
Dados estatísticos							
	$\bar{x}$ (g/100g)	$r = s_r$ (g/100g)	$CV_r$ (RSD <sub>r</sub> ) (%)	$s^2$	$r = 2,8 \times s_r$	$CV_{Horwitz}$ (%)	HorRat <sub>r</sub>
Farinha de soja	21,98	0,60	2,47	0,36	1,68	2,51	1,1
Mortadela	14,94	0,66	4,42	0,44	1,85	2,66	1,7

*R1 a R7 = repetições independentes do ensaio para cada matriz; M = média;  $s_r$  = estimativa do desvio-padrão de repetibilidade;  $CV_r$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de repetibilidade; HorRat<sub>r</sub> = valor HorRat de repetibilidade;  $CV_{Horwitz}$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de repetibilidade predito pela equação de Horwitz.*

O laboratório obteve índices de repetibilidade ( $r$ ) para a análise de gordura total em mortadela e farinha de soja de 1,85% e 1,68%, respectivamente.

Em seguida, foi avaliado se a precisão quanto à repetibilidade era aceitável, utilizando-se o valor de HorRat calculado com base na relação entre o coeficiente de variação obtido em condições de repetibilidade ( $cv_r$ ) e o coeficiente de variação predito por meio da equação de Horwitz ( $cv_{Horwitz} = 2^{1-0,5\log c}$ , onde  $c$  é a concentração média de gordura total na amostra). Se o valor HorRat for  $\leq 2,0$ , assume-se que a precisão do método quanto à repetibilidade é satisfatória (WOOD, 1999). No exemplo, os valores HorRat obtidos foram 1,7 e 1,1 para mortadela e farinha de soja, respectivamente, e, portanto, os resultados das análises de gordura bruta para amostras de mortadela e farinha de soja foram considerados satisfatórios quanto à repetibilidade.

## Precisão quanto à reprodutibilidade dos resultados

A reprodutibilidade foi verificada em termos de comparação interlaboratorial, ou seja, o teor de gordura nas amostras de mortadela e de farinha de soja foi determinado por três laboratórios diferentes (laboratório A, B e C); cada analista realizou 7 determinações independentes, em condições de reprodutibilidade. Por isso a variável esteve em quem realizou as análises (o laboratório). Os resultados estão apresentados no Quadro 7.2.

### Quadro 7.2.

Teor de gordura total para as amostras de mortadela e de farinha de soja analisadas em condições de reprodutibilidade (precisão intermediária).

Amostra		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
		Gordura Total (g/100g)						
Mortadela	Laboratório A	15,8	15,2	14,3	15,8	14,5	14,3	14,7
	Laboratório B	15,7	14,5	14,5	14,3	14,4	14,7	14,6
	Laboratório C	15,7	14,5	14,1	15,1	15,0	14,7	14,6
Farinha de soja	Laboratório A	22,02	20,75	22,18	22,47	22,49	21,72	22,21
	Laboratório B	22,02	22,07	22,00	21,99	20,92	20,58	22,08
	Laboratório C	22,10	22,28	21,70	19,68	19,78	19,88	19,36
Dados estatísticos								
	$\bar{x}$ (g/100g)	$s_R$ (g/100g)	$CV_R$ (RSD <sub>R</sub> ) (%)	$S^2_R$	$R = 2,8 \times s_R$	$CV_{Horwitz}$ (%)	HorRat	
Mortadela	14,81	0,54	3,65	0,29	1,51	2,67	1,4	
Farinha de soja	21,44	1,02	4,76	1,04	2,85	2,52	1,9	

R1 a R7 = repetições independentes do ensaio para cada matriz;  $M$  = média;  $s_R$  = estimativa do desvio-padrão de reprodutibilidade;  $CV_R$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de reprodutibilidade;  $HorRat_R$  = valor HorRat de reprodutibilidade;  $CV_{Horwitz}$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de reprodutibilidade predito pela equação de Horwitz.

Os índices de reprodutibilidade (R) quanto à precisão do laboratório para os resultados de gordura, para as matrizes mortadela e farinha de soja, foram 1,51 e 2,85, respectivamente.

Para avaliar se a precisão quanto à reprodutibilidade era aceitável, utilizou-se o valor de HorRat, calculado com base na relação entre o coeficiente de variação obtido em condições de reprodutibilidade ( $CV_R$ ) e o coeficiente de



variação predito por meio da equação de Horwitz ( $CV_{\text{Horwitz}} = 2^{1-0,5\log c}$ , onde  $c$  é a concentração média de gordura na amostra). Se o valor HorRat for  $\geq 2,0$ , assume-se que a precisão do método quanto à reprodutibilidade é satisfatória (WOOD, 1999). Os valores HorRat obtidos foram 1,4 e 1,9 para mortadela e farinha de soja, respectivamente, e os resultados das análises de gordura total para amostras de mortadela e farinha de soja foram considerados satisfatórios quanto à reprodutibilidade. O Capítulo 4 apresenta exemplos para aplicação dos índices de repetibilidade e de reprodutibilidade (R) na rotina do laboratório.

### 3.2 Exatidão dos resultados

Para avaliar o desempenho do laboratório quanto à determinação de gordura em mortadela e farinha de soja, foram utilizados materiais de referência certificado (MRC) com valor certificados de:  $14,94 \pm 0,66\%$  e  $21,98 \pm 0,60\%$ , respectivamente. Por sua vez, os valores encontrados experimentalmente para o MRC (com sete repetições) foram  $20,68 \pm 1,28\%$  (m/m) de gordura para farinha de soja e para a matriz mortadela,  $14,67 \pm 0,47\%$  (m/m) de gordura.

A avaliação “exatidão dos resultados para a análise de gordura nas matrizes farinha de soja e mortadela” foi realizada por meio do erro relativo (ER); Índice Z; Erro normalizado (En) e Recuperação (Rec) (Tabela 7.1).

**Tabela 7.1.**.....  
A exatidão dos resultados da análise de gordura total para as matrizes farinha de soja e mortadela.

Parâmetros	$X_i$	$S_i$	$X_v$	$S_v$
Mortadela	14,67	0,47	14,94	0,60
Farinha de soja	20,68	1,28	21,98	0,66
Testes	ER	z	En	Rec
Mortadela	1,81	-0,4	-0,3	98,2
Farinha de soja	5,91	-2,2	-0,9	94,1

## 4 Controle dos parâmetros críticos da análise / fontes de erro

A análise de gordura apresenta várias etapas as quais podem ser fontes de erro, uma vez que o resultado final da análise é dependente da qualidade de cada etapa do processo analítico. Assim, as fontes de erros precisam ser identificadas minimizadas e/ou controladas por meio de ações corretivas e preventivas e com a adoção de boas práticas de laboratório. Para a garantia da qualidade analítica na determinação de Gordura Total são relevantes, na condução do ensaio, a observação e controle dos seguintes aspectos.

### Analistas

Os analistas devem receber treinamento adequado para o desempenho competente do ensaio e da operação dos equipamentos.

### Solventes, Equipamentos e Condições Ambientais

A qualidade do solvente é essencial para a qualidade dos resultados, sendo recomendado solvente com certificado de análise/ rastreabilidade.

É necessário o laboratório adotar procedimentos de verificação da temperatura do extrator e da estufa, bem como da taxa de variação de temperatura na estufa. Quanto à balança, é essencial a calibração e o procedimento de verificação intermediária.

Ainda o laboratório deve dispor de um sistema de controle/monitoramento das condições ambientais, nos aspectos físicos (temperatura, umidade) e microbiológicos (REMESP, 2014).

### Características químicas e físicas da Amostra

Na quantificação de gordura total, o resíduo obtido não é constituído unicamente por lipídios, mas por todos os compostos que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo solvente, incluindo ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, lecitinas, ceras, carotenoides, pigmentos, vitaminas A e D etc., os quais, em função da composição química da matriz, podem representar uma diferença significativa na determinação (IAL, 2008). Assim, características químicas da matriz são determinantes para o preparo da amostra, para a escolha de solventes e método adotado.

## Amostras sólidas

Para amostras sólidas, o tamanho de partícula/grau de trituração é essencial uma vez que, para a eficiência do processo de liberação extrativa, um dos aspectos relevantes é a penetração do solvente na matriz. Logo o controle do processo de trituração da amostra bem como o grau de homogeneização são fundamentais para a qualidade dos resultados.

Para produtos desidratados, o método mais comum é o uso de peneiras padronizadas (quanto à abertura das malhas e à espessura dos fios), em que a matriz sólida é colocada no topo de uma série de peneiras; cada peneira possui abertura menor que a anterior e a amostra é submetida à agitação, resultando por meio do dispositivo num gradiente decrescente de tamanho de partícula. Este é caracterizado pela média aritmética da distribuição das partículas nas peneiras de diferentes aberturas (GOMIDE, 1983). Para outras amostras sólidas, como produtos cárneos, esses são triturados em moedores de disco com furação específica.

## Características químicas da amostra

Matrizes com alta proporção de açúcares, proteínas e umidade podem dificultar a extração completa da fração lipídica. Como o caso de produtos derivados do leite, pão, produtos fermentados, açucarados e produtos de origem animal em que a maior parte dos lipídios está ligada a proteínas e carboidratos. Essas matrizes requerem hidrólise ácida ou básica antes da etapa de extração por solventes para liberação e posterior quantificação e/ou uso de outros métodos (CECCHI, 2003).

Cabe ainda salientar que, no caso de lipídios, esses têm uma grande faixa de relativa hidrofobicidade; é praticamente inviável a utilização de um único solvente universal para a extração deles. Enquanto os lipídios neutros estão ligados covalentemente e podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares, os lipídios polares estão ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio e requerem solventes polares capazes de quebrar tais ligações e liberá-los (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009).

Diante da complexidade de algumas matrizes (interações distintas entre seus constituintes) e da variabilidade de suas características químicas, é necessário avaliar e validar procedimentos de extração considerando a temperatura, o tempo de extração e o tipo de solvente a ser utilizado no procedimento analítico. A avaliação quantitativa do teor de lipídios pode ser feita por meio

da extração com diferentes solventes a frio ou a quente. Outros métodos têm sido adotadas/reconhecidas por órgãos como AOAC e desenvolvidas abaixo.

## Método de Bligh-Dyer

Método consiste na extração de gordura a frio utilizando-se a mistura de três solventes: clorofórmio – metanol – água. A amostra é misturada com o metanol e clorofórmio numa proporção que formam uma só fase com a amostra. Adiciona-se mais clorofórmio promovendo a formação de duas fases distintas: uma de clorofórmio, que contenha lipídios, e outra de metanol mais água (da amostra), com substâncias não lipídicas. A fase do clorofórmio com a gordura é isolada e, após a evaporação do clorofórmio, obtém-se a quantidade de gordura por pesagem. Tem aplicação não só em produtos de trigo e soja, como também em produtos com altos teores de umidade.

## Métodos de Soxhlet de Goldfish

Os métodos Soxhlet e Goldfish são procedimentos de extração dos lipídios que empregam solventes a quente, e são executados em três etapas: extração da gordura da amostra com solvente; eliminação do solvente por evaporação e a quantificação da gordura por pesagem. No método Soxhlet, utiliza-se o refluxo do solvente e o processo é intermitente, enquanto no Goldfish o processo de extração é contínuo e mais rápido. O método de Soxhlet é de execução relativamente simples, podendo ser recomendado tanto para amostras de origem animal quanto vegetal, contudo quando não houver necessidade do emprego posterior do extrato (IAL, 2008). Geralmente o solvente utilizado é o éter de petróleo e a porcentagem de lipídio é calculada pela equação:

$$\% \text{ Lipídeos} = \frac{100 \times \text{lipídeos (g)}}{\text{amostra (g)}}$$

## Método de Gerber

Esse método consiste no tratamento da matriz com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. O ácido rompe o filme de proteína existente ao redor do glóbulo de gordura, o álcool isoamílico facilita a separação da gordura e reduz o efeito de carbonização do ácido sulfúrico sobre a gordura. Após a digestão, a amostra é centrifugada no butirômetro. Há vários tipos de butirômetros, com escalas específicas para distintos produtos (IAL, 2008). O método de Gerber

aplica-se principalmente em leite, produtos lácteos e produtos processados de carne e peixe.

## Método Rose-Gottlieb e Mojonier

O método consiste no tratamento da matriz com hidróxido de amônia e álcool para hidrolisar a ligação proteína-gordura; a gordura separada é então extraída com éter de petróleo e éter etílico. O álcool precipita a proteína que se dissolve na amônia e a gordura separada é extraída com solventes. Aplica-se o método em produtos com alto teor de açúcar, incluindo leite condensado (NIELSEN, 2010).

Os compostos lipídicos apresentam alta absorção na região de carbonila na faixa de absorção do infravermelho. NIR tem sido utilizado para as leguminosas e outros produtos alimentares. Contudo o uso efetivo do método depende da calibração com matrizes comparáveis usando-se outro método aprovado; por essa razão, a técnica é mais comumente aplicada em análises de rotina de um grande número de amostras muito semelhantes, em alimentos como cereais e produtos lácteos (GREENFIELD; SOUTHGATE, 2003).

## 5 Conclusão

A gordura é especialmente importante para os produtos alimentícios nos aspectos nutricional e sensorial. Por isso há uma demanda contínua visando à adequação e ao controle de qualidade analítica para a obtenção de resultados de qualidade para o atendimento da Legislação e o fornecimento de informações fidedignas quanto à composição – qualidade e quantidade - na rotulagem dos produtos.

Nesse contexto, devido à crescente diversificação de produtos que a indústria de alimentos tem oferecido/inserto no mercado, produtos com baixos teores de gordura (*low fat*) ou sem adição de gordura (*non fat*), por meio do uso de ingredientes e novas tecnologias. Tem-se observado uma demanda contínua por novos métodos visando à adequação a novas matrizes para determinação mais eficiente da fração lipídica dos alimentos, bem como a quantificação de compostos das diferentes classes da fração lipídica com inclusão de métodos cromatográficos/instrumentais para cumprir a rotulagem nutricional (AUED-PIMENTEL et al., 2010).

## 6 Referências

- AUED-PIMENTEL, S. et al. **Comparison of gas chromatographic and gravimetric methods for quantization of total fat and fatty acids in foodstuffs**. *Química Nova*, v. 33, p.76 - 84, 2010.
- BRASIL, 1999. **Métodos Analíticos Físico-químicos para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes**. Instrução Normativa n.º 20 de 21.07.99, publicada no DOU de 09.09.99 – p.83 – 87. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasil.
- BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). **Métodos Analíticos para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes**. I. Métodos microbiológicos. II. Métodos Físico-químicos. Portaria n.º 001 de 07.10.1981. Brasília, 123 p. 1981.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira: Promovendo a alimentação saudável** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição – Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 236p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal**. *Química Nova*, v. 32, p. 849-854, 2009.
- CARPENTER, D. E; NGEH-NGWAINBI, J.; LEE, S. 1993. **Lipid analysis**. In D.M. Sullivan & D.E. Carpenter, eds. *Methods of analysis for nutritional labeling*, pp. 85–104. Arlington, VA, USA: AOAC International.
- CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. 2. ed, Campinas: Ed. da Unicamp, 2003. 208 p.
- CHRISTIE, W.W. **Lipid analysis**. Bridgwater, UK: The Oily Press, 2003.
- FENNEMA, O. R.; Damodaran, S.; Parkin, K. **Química de Alimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.
- GOMIDE, R. **Operações Unitárias – Operação com Sistemas de Sólidos Granulares**. v.1. Sao Paulo: Reynaldo Gomide, 1983.
- GREENFIELD, H.; SOUTHGATE, T. **Food Composition Data**. 2. ed. Rome. Organization of the United Nations: FAO, 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/008/y4705e/y4705e00.htm>> Acesso em 06 mar. 2014.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.p. 1020. Versão eletrônica.
- NIELSEN, S.S. **Food Analysis**. 4<sup>th</sup> ed., New York (USA): Springer, 2010.
- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC**; 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg (USA): AOAC International, 2005.
- PRADO, S. B. R. et al. **Variação de energia, fibra alimentar e gordura total no decorrer de 10 anos em alimentos processados**. PS-13-230. 12.º Congresso Nacional da SBAN. 13 a 16 de agosto de 2013. Foz do Iguaçu. PR. *Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition* v. 38, Supl. p. 1- 475, 2013.

**REMESP.** Rede Metrológica do Estado de São Paulo. In: Comitê Técnico de Química de Alimentos (CTQA) **Documento CTQA. 2014. Campinas. 2014.**

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, p.624-632, 1999.

# FIBRA ALIMENTAR TOTAL

*Gilberto Batista de Souza  
Vera Sonia Nunes da Silva  
Yolanda Boza*

## 1 Introdução

As fibras alimentares são constituídas principalmente de substâncias de origem vegetal originadas da parede celular e, em menor parte, de polissacarídeos extraídos de outras partes das plantas ou ainda sintetizados por micro-organismos. As fibras podem ser classificadas de acordo com a estrutura, com a solubilidade em água, e de acordo com o grau de fermentação. Nos alimentos, as fibras podem estar naturalmente presentes, ou serem adicionadas durante a preparação, processamento, ou durante o consumo.

A Fibra Alimentar Total (FAT), em função da solubilidade em água, pode ser classificada em solúvel (FAS) e insolúvel (FAI). A definição de fibra alimentar passou por várias alterações e, diante da necessidade de fornecer informação precisa ao consumidor, foi mandatório definir precisamente a Fibra Alimentar, uma vez que era requisito para se adequar/adotar o método para sua determinação. Atualmente, na composição declarada no rótulo dos alimentos, a fração de Fibra Alimentar é referente à Fibra Total - conforme a definição proposta pelo *Codex Alimentarius* (CODEX, 2008).

Segundo o CODEX, fibra alimentar consiste em polímeros de carboidratos com 10 ou mais unidades monoméricas que não são hidrolisadas pelas enzimas endógenas no intestino delgado de humanos e podem pertencer às



seguintes categorias: polímeros de carboidratos comestíveis presentes nos alimentos na forma em que são consumidos; polímeros de carboidratos obtidos de alimentos crus por métodos químicos, enzimáticos ou físicos e que apresentaram efeito fisiológico benéfico à saúde em estudos científicos amplamente aceitos por autoridades competentes, e polímeros de carboidratos sintéticos que apresentaram efeito fisiológico benéfico à saúde em estudos científicos amplamente aceitos por autoridades competentes.

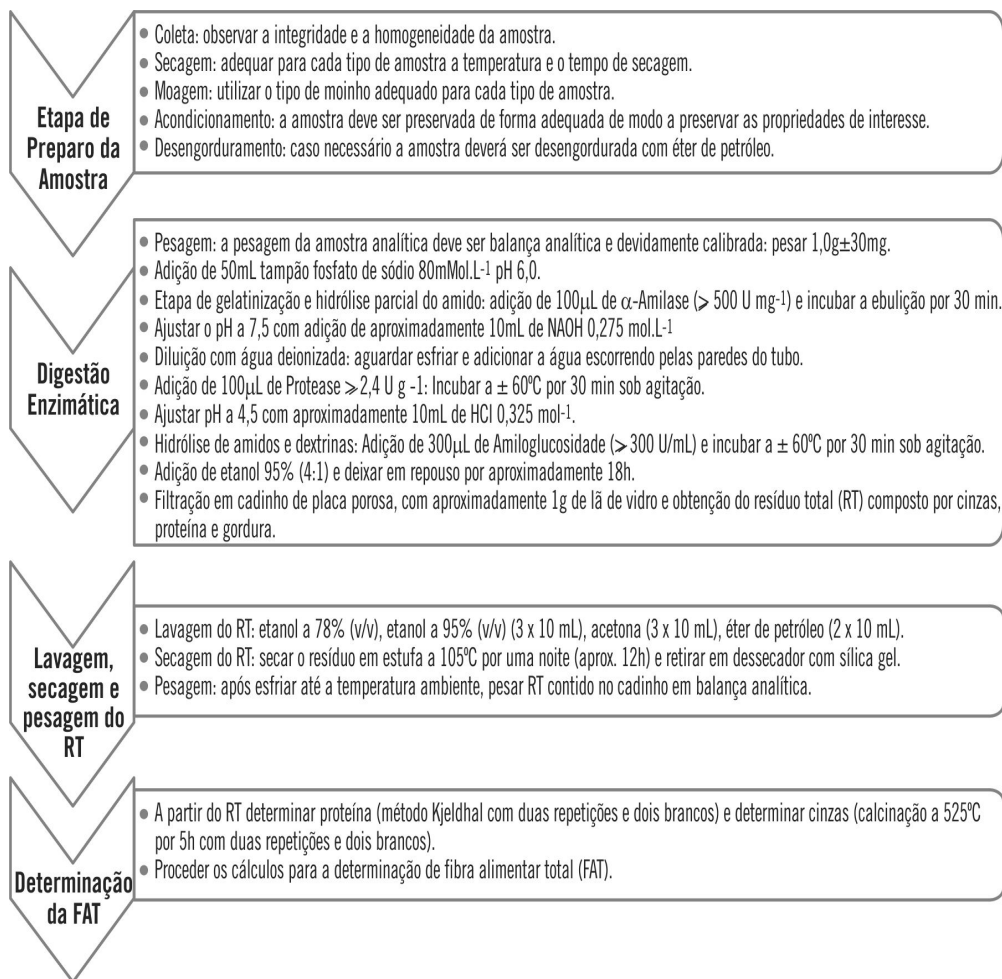
As dietas ricas em fibras estão associadas à prevenção e manutenção da saúde, uma vez que previnem o aparecimento de câncer no intestino, auxiliam na eliminação de gorduras e toxinas e induzem a saciedade promovendo a menor ingestão de alimentos e calorias, contribuindo para a redução da obesidade (BINGHAM; 2003; CAMPOS, 1990). Diante de inúmeros estudos clínicos comprobatórios dos benefícios de sua ingestão, há uma intensiva promoção na ingestão de alimentos ricos em fibras, sendo o Japão um dos países pioneiros a promover a adição de fibras em alimentos e bebidas. Concomitantemente, o *Food and Drug Administration* (FDA, 2012) autorizou as alegações dos benefícios da ingestão de aveia e do farelo de aveia na redução do colesterol devido à presença de  $\beta$ -glucanas.

Em decorrência da importância das fibras na dieta e impulsionados pelo setor produtivo em decorrência da necessidade de adequar seus produtos para atender às exigências de órgãos oficiais regulamentadores, além de estar em consonância com estudos/investigação de problemas de nutrição (ANVISA, 1998; 1999, 2012; FOOD AND NUTRITION BOARD, 2002), é fundamental a melhoria contínua no desempenho analítico da determinação de fibras pelo setor produtivo de alimentos.

## 2 Análise de fibra alimentar total na farinha de soja

### Proposta de procedimento analítico

Para a análise de Fibra Alimentar Total na farinha de soja foi utilizado o método 985.29 da AOAC (2006) e a Portaria n.º 41 de 14 de janeiro de 1998 da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), apresentado na Figura 8.1.



**Figura 8.1.** .....  
Fluxograma de determinação de Fibra Alimentar em Farinha de Soja

### 3. Etapas do método de determinação do teor de fibra alimentar total (FAT)

As amostras pesadas são submetidas à digestão enzimática sequencial, extração com etanol, filtração, secagem e pesagem do resíduo. A seguir, estão descritas as condições das distintas etapas do método analítico.

## Digestão enzimática sequencial

Consiste na adição sequencial de enzimas para a remoção de material proteico e amiláceo. Durante a digestão enzimática, ocorre a gelatinização seguida da hidrólise e despolimerização do amido pela ação  $\alpha$ -amilase termoestável e a hidrólise dos fragmentos de amido em glicose pela amiloglucosidase enquanto as proteases promovem a despolimerização e solubilização das proteínas, conforme se descreve a seguir.

### a) $\alpha$ -Amilase

Adição de 100 $\mu$ L de  $\alpha$ -Amilase ( $\geq 500$  U  $\text{mg}^{-1}$ ) à suspensão da amostra em tampão fosfato de sódio 80 mM (50 mL) a pH  $6.0 \pm 0.2$ , seguida da incubação a 95 - 100°C por 30 min em banho-maria.

### b) Protease

À suspensão da amostra previamente resfriada e com pH ajustado com solução de hidróxido de sódio (0,275 N) a  $7.5 \pm 0.2$  adicionam-se 100 $\mu$ L de protease ( $\geq 2,4$  U  $\text{g}^{-1}$ ) e incuba-se a 60°C por 30 min sob agitação contínua.

### c) Amiloglucosidase

Adiciona-se 300  $\mu$ L amiloglucosidase ( $\geq 300$  U/mL) à amostra resfriada e com pH previamente ajustado com ácido clorídrico a 4.0 – 4.6; incuba-se a 60°C por 30 min sob agitação contínua.

## Extração, secagem e pesagem

Adiciona-se álcool etílico (95% e pré-aquecido a 60°C) à amostra digerida - na proporção de 1:4, deixando em repouso em temperatura ambiente por  $\pm 18$  horas. Filtra-se em cadinho de placa porosa com  $\pm 1$ g de lã de vidro e, em seguida, lava-se o resíduo com etanol, acetona e éter de petróleo. Após a secagem do precipitado e pesagem, quantifica-se cinzas (incineração a 525°C por 5 horas) e proteínas pelo método de Kjeldahl. Para cada análise realiza-se ensaio em branco, para medir qualquer contribuição a partir de resíduos nos reagentes.

## Cálculo do teor de fibra alimentar total

O teor de fibra alimentar total (FAT) referente à amostra de farinha de soja previamente desengordurada é calculado de acordo com a expressão:

### Cálculo da FAT (g/100g)

$$FAT = \frac{mRT - P - C - B}{m} \times 100$$

onde:

FAT = Fibra Alimentar Total (g/100g)

mRT = média das massas dos resíduos (g)

P = média da proteína em 2 resíduos (g)

C = média das cinzas em 2 resíduos (g)

m = massa média das tomadas de ensaio (g)

B = ensaio em branco (g) ( $B = mRT_b - P_b - C_b$ ).

Cálculo do conteúdo de proteína (g) (usando o fator 6,25):

$$P = V_{HCl} \times N_{HCl} \times 0,014 \times 6,25$$

Cálculo do conteúdo de cinzas (g).

$$C = (Cadinho + lâ + cinzas) - (Cadinho + lâ)$$

**OBS.:** Como a amostra, no caso a farinha de soja, foi desengordurada antes da análise de FAT, no cálculo final deve ser considerado o teor de lipídios retirado da amostra, para o resultado ser expresso na amostra original. É importante também conhecer a umidade antes e após a amostra ter sido desengordurada para que esses valores também sejam considerados no cálculo final.

## 4 Resultados e Discussão

O desempenho/controlado laboratorial para a análise de fibra alimentar em farinha de soja foi avaliado por meio da precisão e exatidão dos resultados.

## 4.1 Precisão: repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados

Na análise da precisão da análise de Fibra Alimentar em farinha de soja a repetibilidade foi determinada por 7 medições independentes realizadas pelo mesmo analista, com o mesmo material e as mesmas condições de ensaio. A reprodutibilidade foi determinada em termos comparação interlaboratorial, ou seja, o teor de Fibra Alimentar nas amostras de farinha de soja foi determinado em condições de reprodutibilidade (laboratório A, B e C). Os resultados da análise de FAT para repetibilidade e reprodutibilidade estão apresentados nos Quadros 8.1 A e 8.1 B, respectivamente.

**Quadro 8.1.** .....  
Repetibilidade (A) e Reprodutibilidade (B) para os resultados de fibra alimentar em farinha de soja.

Matriz	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	Fibra alimentar (g/100g)						
Farinha de soja	21,02	22,56	21,16	21,41	21,44	20,76	21,19
Dados estatísticos							
	$\bar{x}$ (g/100g)	$r = s_r$ (g/100g)	$CV_r$ (RSD <sub>r</sub> ) (%)	$s^2$	$r = 2,8 \times s_r$	$CV_{Horwitz}$ (%)	HorRat <sub>r</sub>
Farinha de soja	21,36	0,58	2,69	0,34	1,61	2,52	1,1

R1 a R7 = repetições independentes do ensaio para cada matriz; M = média;  $s_r$  = estimativa do desvio-padrão de repetibilidade;  $CV_r$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de repetibilidade; HorRat<sub>r</sub> = valor HorRat de repetibilidade;  $CV_{Horwitz}$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de repetibilidade predito pela equação de Horwitz.

Amostra	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
	Fibra alimentar (g/100g)							
Farinha de soja	Laboratório A	21,02	21,06	21,00	20,99	22,56	22,55	21,08
	Laboratório B	21,37	21,33	21,41	21,45	21,14	21,18	21,12
	Laboratório C	21,21	20,91	21,47	21,48	20,99	21,13	20,47
Dados estatísticos								
	M (g/100g)	$s_R$ (g/100g)	$CV_R$ (RSD <sub>R</sub> ) (%)	$S^2_R$	$R = 2,8 \times s_R$	$CV_{Horwitz}$ (%)	HorRat	
Farinha de soja	21,28	0,48	2,25	0,23	1,34	2,52	0,9	

R1 a R7 = repetições independentes do ensaio para cada matriz; M = média;  $s_R$  = estimativa do desvio-padrão de reprodutibilidade;  $CV_R$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de reprodutibilidade; HorRat<sub>r</sub> = valor HorRat de reprodutibilidade;  $CV_{Horwitz}$  = coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo de reprodutibilidade predito pela equação de Horwitz.

O laboratório obteve índice de repetibilidade ( $r$ ) de 1,61% (Quadro 8.1 A) para análise de fibra alimentar em farinha de soja. Em seguida, foi avaliado se a precisão quanto à repetibilidade era aceitável, utilizando-se o valor de HorRat o qual é calculado com base na relação entre o coeficiente de variação obtido em condições de repetibilidade ( $CV_r$ ) e o coeficiente de variação predito por meio da equação de Horwitz ( $CV_{\text{Horwitz}} = 2^{1-0,5\log c}$ , onde  $c$  é a concentração média de fibra alimentar na amostra). Se o valor HorRat for  $\geq 2,0$ , assume-se que a precisão do método quanto à repetibilidade é satisfatória (WOOD, 1999). No exemplo, o valor HorRat obtido foi 1,1 e, portanto, os resultados para fibra alimentar em amostras de farinha de soja foram satisfatórios quanto à repetibilidade.

O índice de reprodutibilidade ( $R$ ) (Quadro 8.1 B) para a precisão do laboratório quanto aos resultados para fibra alimentar em amostras de farinha de soja foi de 1,34. Para avaliar se a precisão quanto à reprodutibilidade era aceitável, utilizou-se o valor de HorRat, calculado com base na relação entre o coeficiente de variação obtido em condições de reprodutibilidade ( $CV_R$ ) e o coeficiente de variação predito por meio da equação de Horwitz ( $CV_{\text{Horwitz}} = 2^{1-0,5\log c}$ , onde  $c$  é a concentração média de fibra alimentar na amostra). Se o valor HorRat for  $\geq 2,0$ , assume-se que a precisão do método quanto à reprodutibilidade é satisfatória (WOOD, 1999). O valor HorRat obtido foi 0,9 para farinha de soja e, portanto, os resultados das análises para amostras de farinha de soja considerados satisfatórios quanto à reprodutibilidade. No capítulo 4 apresentam-se exemplos para a aplicação dos índices de repetibilidade e de reprodutibilidade ( $R$ ) na rotina do laboratório.

## 4 2 Exatidão dos Resultados

Para se verificar a exatidão dos resultados na análise de fibra alimentar da matriz farinha de soja, foi utilizado um material de referência (MRC) com valor certificado de: 20,95 +/- 0,67% (m/m) de fibra alimentar. Experimentalmente, o valor encontrado para o MRC (com sete repetições) foi de 21,36 +/- 0,58% (m/m) de fibra alimentar.

Conforme o Quadro 8.2, os cálculos para a exatidão dos resultados para fibra alimentar na matriz farinha de soja foram realizados por meio de: erro relativo (ER); Índice Z ( $z$ ); Erro normalizado (En) e Recuperação (Rec) em que foram obtidos os valores de 1,96; 0,6; 0,5 e 102,0, respectivamente.

## Quadro 8.2.....

Cálculo da exatidão para os resultados de FAT em farinha de soja

Parâmetros	$X_i$	$S_i$	$X_v$	$S_v$
Farinha de soja	21,36	0,58	20,95	0,67
Testes	ER	z	En	Rec
Farinha de soja	1,96	0,6	0,5	102,0

## 5 Controle dos parâmetros críticos da análise / fontes de erro

A análise de fibra alimentar apresenta várias etapas as quais podem ser fontes de erro. O resultado final da análise é dependente da qualidade de cada etapa do processo analítico. Assim, as fontes de erros precisam ser identificadas minimizadas e/ou controladas por meio de controles externos e/ou corrigidos por meio de medidas de controle analítico em cada etapa da análise por ações corretivas e preventivas e, ainda, com a adoção de boas práticas de laboratório. Para a garantia da qualidade analítica na determinação de Fibra Alimentar, sugerimos o controle dos elementos a seguir.

### Analistas

Os analistas devem receber treinamento adequado para o desempenho competente do ensaio e da operação dos equipamentos.

### Características químicas e físicas da Amostra

A farinha de soja apresenta alto teor de gordura (> 10%). Por isso, para que o resultado não seja superestimado, deve-se extrair a gordura antes da moagem/peneiragem com éter de petróleo, na proporção de 25 mL por grama de amostra. Repetir o procedimento 2 vezes antes da moagem.

A homogeneização é uma etapa essencial na análise de Fibra Alimentar, uma vez que o tamanho das partículas interfere diretamente na eficácia dos tratamentos enzimáticos. Essa operação pode, portanto, minimizar a ocorrência de diferença significativa na distribuição do tamanho da partícula entre as replicadas. A moagem/trituração deve ser seguida da peneiragem da amostra seca em peneira de malha inferior a 0,5 mm. Durante essa ope-

ração, deve-se assegurar de que a composição da amostra não seja alterada (ex.: perda ou absorção de umidade) e armazenar a amostra em dessecador até a execução da análise. O controle das condições ambientais (temperatura, umidade) na sala de preparo de amostra e as condições de armazenagem da amostra são essenciais.

## Equipamentos

Especialmente por tratar-se de um método enzimático-gravimétrico, é necessário que as balanças e os equipamentos críticos no controle dos fatores que influem na atividade enzimática - incluindo balança, termômetros, micropipetas, material volumétrico (vidrarias) - devem ser calibrados, além e o laboratório adotar práticas de verificação periódicas de desempenho desses. O pHmetro deve ter o multímetro calibrado e o desempenho verificado com solução-padrão de referência certificada a pH 4,0, 7,0 e 10,0 (REMESP, 2014).

## Reagentes

As enzimas devem ter atividade específica e verificada e prévia e periodicamente bem como a cada novo lote, por meio de métodos quantitativos e do uso de padrões específicos. Durante a análise para monitorar a recuperação na digestão, padrões tais como amido, caseína,  $\beta$ -glucana, pectina e *larch galactan* podem ser usados. Neste caso, a recuperação para amido e caseína deve ser próxima de zero, enquanto para os 3 últimos substratos deve ser aproximadamente 100% (Mc CLEARY, 2000).

Pela simplicidade e custo, o método 985.29 da AOAC tem sido adotado pelas agências governamentais de vários países, para a análise de rotina da rotulagem nutricional. Cabe salientar que não há um método analítico universal que seja aplicável a todo tipo de matriz nem que quantifique todos os componentes da fibra alimentar.

Estudos na literatura apontam a etapa de precipitação de etanol e as correções gravimétricas, relativas a cinzas e proteína, como principais fatores de dispersão dos resultados para fibra alimentar. Segundo esses estudos, durante a precipitação com etanol pode ocorrer precipitação, em álcool, dos sais dos tampões usados na análise (Na e Ca), bem como exclusão de oligossacarídeos solúveis em água e não digestíveis (AACC, 2001; MAÑAS, BRAVO, SAURA - CALIXTO, 1994; PICOLLI DA SILVA, 2003). Neste caso,



pode-se usar como complemento o método AOAC 991.42 (*Insoluble Dietary Fiber in Food and Food Products*) para a determinação da fração da fibra alimentar insolúvel e posterior determinação da porcentagem de fração de fibra alimentar por diferença (SANTOS, 2013; PICOLLI DA SILVA, 2003). O CODEX (2011) relata métodos para os distintos componentes da Fibra Alimentar.

Uma vez que a natureza da matriz influi na magnitude das correções gravimétricas é necessário se observarem os pontos críticos de controle nas determinações das frações cinza e proteína da amostra, os quais estão descritos nos capítulos 6 e 4, para minimizar a dispersão dos resultados.

## 6 Conclusão

As fibras alimentares são importantes no produto alimentício/alimento não apenas por suas propriedades nutricionais, mas também pelas suas propriedades tecnológicas, uma vez que, as propriedades das fibras podem permitir inúmeras aplicações na indústria de alimentos, como substitutos de gordura ou como agente estabilizante, espessante e emulsificante. Assim podem ser importantes ferramentas de inovação na produção de diferentes produtos: bebidas, sopas, molhos, sobremesas, derivados de leite, biscoitos, massas e pães (CHO; DREHER, 2001; KIPKA, 2008).

Ainda cabe salientar que o conhecimento do teor de fibra nos alimentos é importante para a informação da rotulagem nutricional para melhor esclarecimento ao consumidor, uma vez que, embora a ingestão das fibras promova diversas ações benéficas ao nosso organismo, é desaconselhável o consumo excessivo, pois pode interferir na absorção de minerais, especialmente de cálcio e zinco (SANTOS, 2013).

A contínua demanda mercadológica por inovações na área de alimentos e os crescentes estudos clínicos/nutricionais sobre as propriedades das fibras na alimentação promovem revisão/alterações na Legislação e, consequentemente, na demanda por melhoria no desempenho dos resultados obtidos para Fibra Alimentar bem como por desenvolvimento/adequação de métodos. Esse fato evidencia-se pela crescente inclusão de novos /alterações de métodos, como os métodos AOAC 991.43; 2001.03 e AOAC 2009.01, referentes à presença de amido resistente, maltodextrinas resistentes e de oligossacarídeos não digeríveis, os quais envolvem técnicas enzimático-gravimétrica e cromatografia líquida de alta eficiência (CODEX, 2011).

## 7 Referências

- American Association of Cereal Chemists (AACC). The definition of dietary fiber. **Cereal Foods World**, v.46, p. 113 - 126, 2001.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists .2006. **Total Dietary Fiber in Foods**. (Method 985.29). Official Methods of Analysis. 18th ed. Arlington, 2006. 1141 p.
- BINGHAM, S. A. et al. Dietary fiber in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. **The Lancet**, v. 361, p. 1496 – 1501 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Ministério da Saúde. Portaria n.º 27. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 de janeiro. 1998.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Ministério da Saúde. Resolução n.º 54. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 de nov. 2012.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA). Portaria n.º 41, de 14 de janeiro de 1998. Publicada no **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 de janeiro de 1998.
- CAMPOS, M. A. P. Fibra: A fração alimentar que desafia os estudiosos. **Alimentos e Nutrição**, v. 2, p. 53–63. 1990.
- CHO, S.S.; DREHER M.L. **Handbook of Dietary Fiber**. New York, NY: Marcel Dekker Inc; 2001.868 p.
- CODEX - **Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses** (CCNFSDU). 30th Session. Cape Town, South Africa 3 - 7 November 2008, ALINORM 09/32/26.
- CODEX - Codex Alimentarius Commission. JOINT FAO/WHO. **Food Standards Programme**. Thirty fourth Session. Geneva, Switzerland, 4-9 July 2011.
- FOOD AND NUTRITION BOARD (FNB). **Dietary reference intakes: energy, carbohydrates, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids**. Washington, DC: National Academies Press, 2002. Disponível: <<http://www.nap.edu>> Acesso em 06 mar. 2014.
- GREENFIELD, H.; SOUTHGATE, T. **Food Composition Data**. 2. Ed. Rome. Organization of the United Nations: FAO, 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/008/y4705e/y4705e00.htm>> Acesso em 06 mar. 2014
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. - 4. ed., 1.ed. digital. Coordenadores: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- KIPKA, D. Dossiê: Fibras Alimentares. **Food Ingredients Brasil**, v. 3, p. 42 – 65, 2008.
- MAÑAS, E; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Sources of error in dietary fiber analysis. **Food Chemistry**, v. 50, p. 331 – 342, 1994.

MC CLEARY, B. V. et al. Determination of total dietary fiber (codex definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 93, p. 221-233, 2010.

MENDES, A. R. **Implementação e validação de uma metodologia para análise de fibra alimentar**. Dissertação (Mestrado) Química Forense. Universidade de Coimbra. Julho de 2011.

Disponível em: < <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/16081/1/.pdf> > .  
Acesso em: 12.10.2013.

PICOLLI DA SILVA, L. et al. Avaliação do método enzimico-gravimétrico AOAC 985.29, para a determinação da fibra alimentar em grãos crus de aveia e milho. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)**, v. 53, p. 393 - 399, 2003.

**REMESP**. REDE Metrológica do Estado de São Paulo. In: Comitê Técnico de Química de Alimentos (CTQA). **Documento CTQA. 2014. Campinas. 2014.**

SANTOS, J. R. **Determinação do teor de fibra alimentar em produtos hortofrutícolas**. 2013. 63 p. Dissertação (Mestrado). Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa. Lisboa, 2013.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, p.624-632, 1999.

# ANEXO 1

Gilberto Batista de Souza

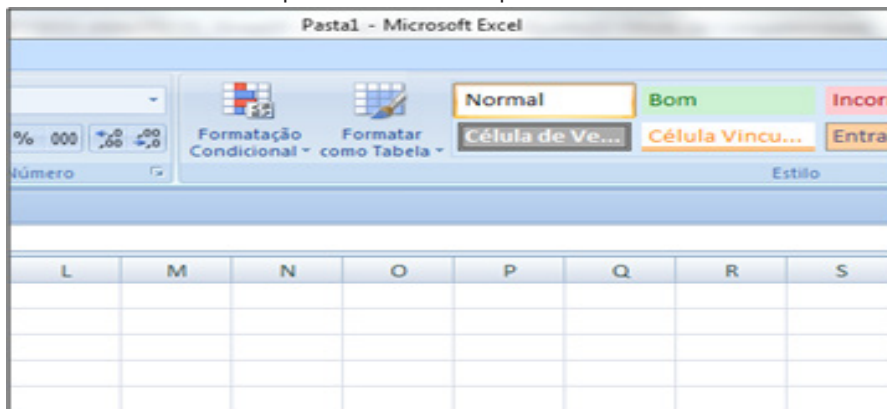
Execução da análise de variância (ANOVA) de fator único, utilizando-se a ferramenta de análises de dados do Microsoft Excel 2007®.

## Passo a passo

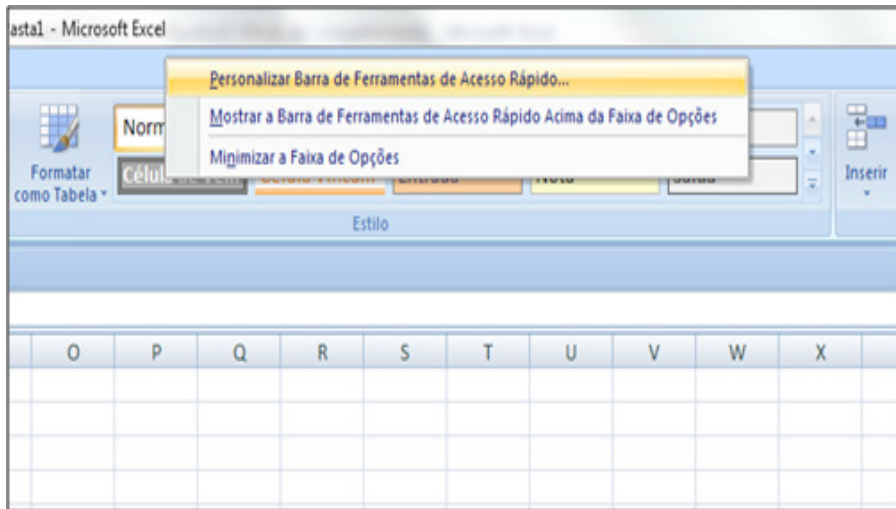
- 1 - Planilha-modelo: resultados de um estudo para a determinação da avaliação da reprodutibilidade interlaboratorial.

Laboratório	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
A	12,6	12,7	12,7	12,2	11,8	12,2	11,3
B	12,3	11,7	12,8	11,4	11,3	12,7	11,5
C	12,7	11,8	12,2	11,5	11,3	11,4	11,7

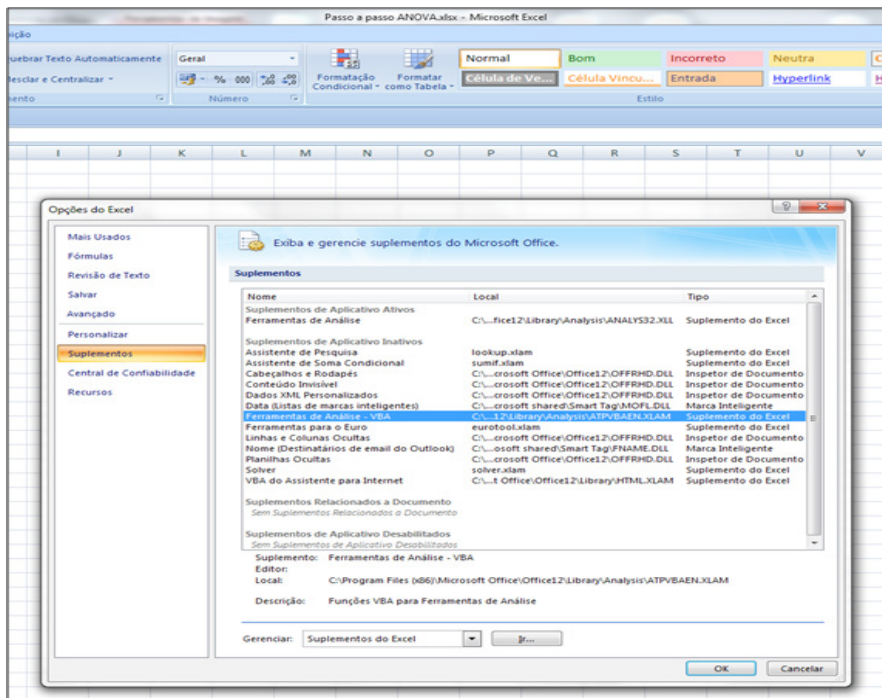
- 2 - Para habilitar a ferramenta de análises de dados: clicar com o botão direito do *mouse* na primeira linha superior do Microsoft Excel 2007®.



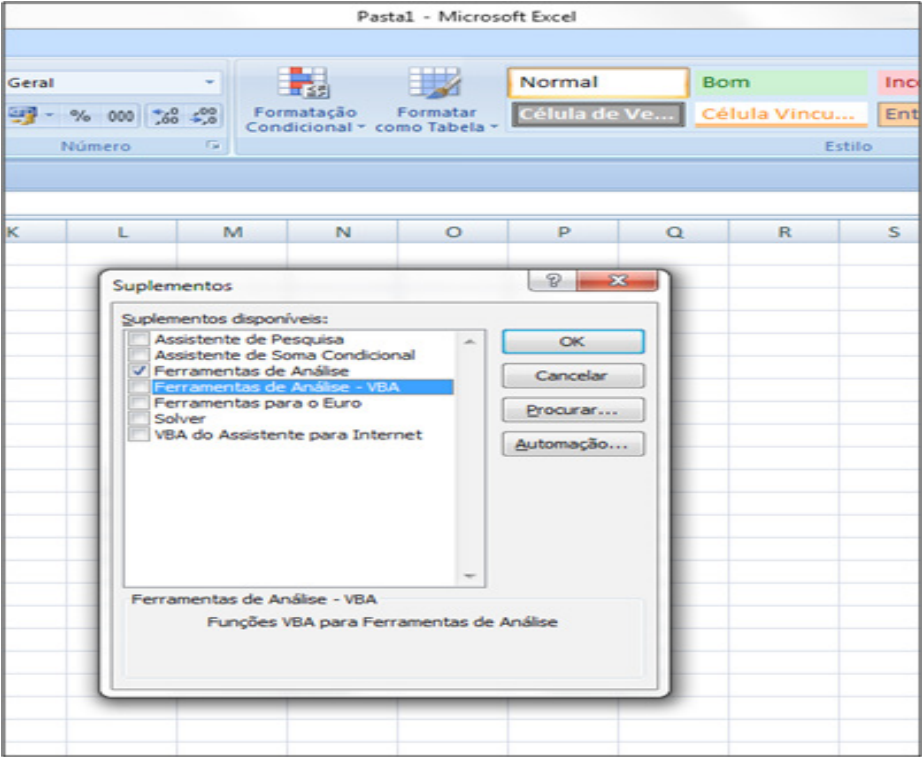
3 - Clicar com o botão esquerdo do *mouse* em “Personalizar Barra de Ferramentas de Acesso Rápido”.



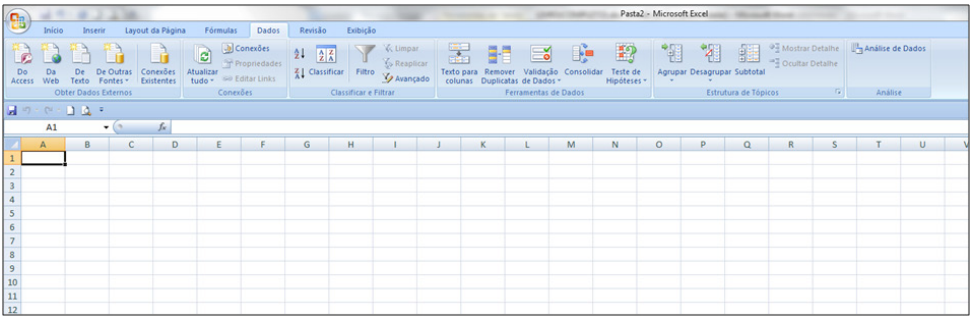
4 - Clicar com o botão esquerdo em “Suplementos/Ferramentas de Análise - VBA”; em seguida, clicar em “Ir”.



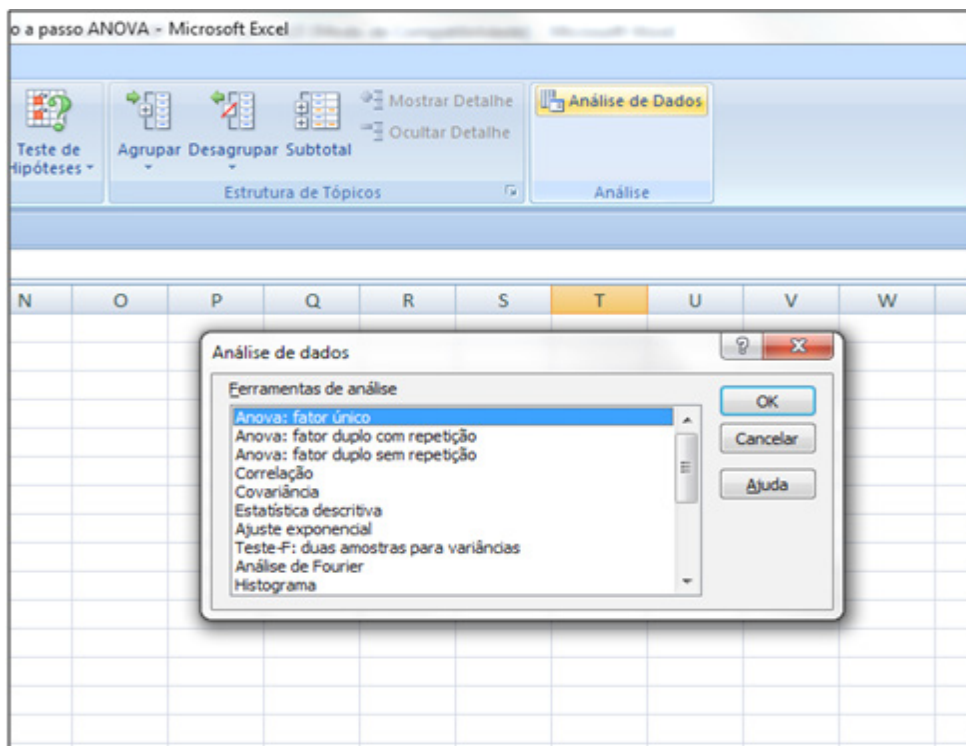
5 - Selecionar “Ferramentas de Análise - VBA” e clicar OK.



6 - Clicar em “Dados”; habilitará “Análise de Dados” na barra de ferramentas de acesso rápido.

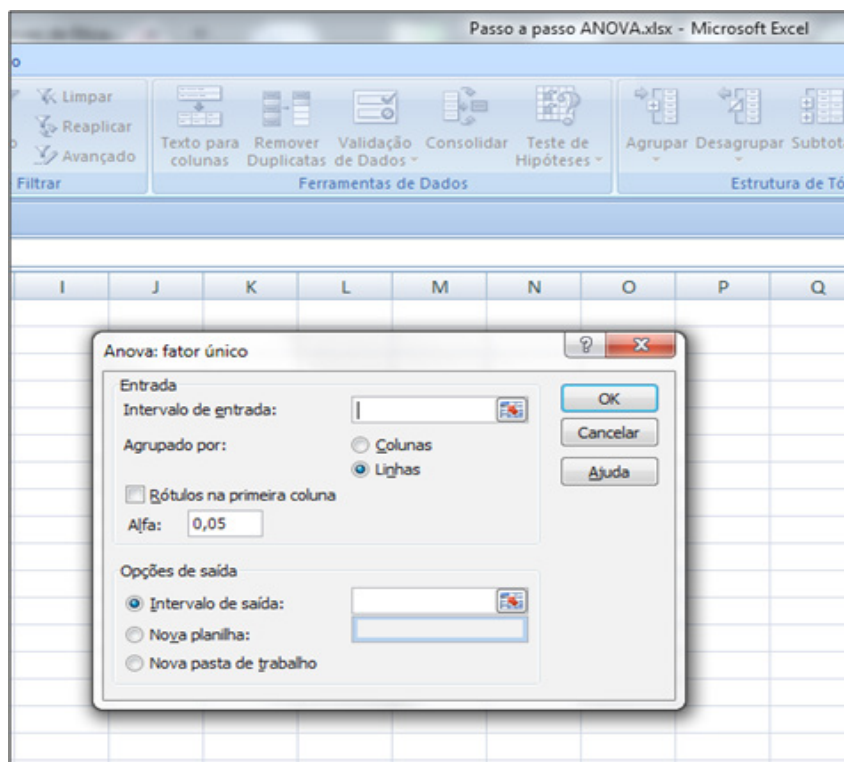


7 - Clicar em “Análise de Dados”, selecionar a Ferramenta “Anova: fator único”.



8 - Selecionar “Linhas”; clicar na seta vermelha no “Intervalo de entrada” e selecionar os dados na planilha (apenas os valores numéricos do exemplo no item 1 desse anexo). Selecionar também em opções de saída “Intervalo de saída” e, na seta vermelha, selecionar uma célula na planilha. Após, clicar em “OK” e será calculada a ANOVA: fator único.

8.1 - Em seguida, nas Opções de saída clicar em “Intervalo de saída” e, na seta vermelha, selecionar uma célula na planilha. Em seguida, clicar em “OK” - a ANOVA: fator único - será calculada conforme apresentado no item 9.



9 - ANOVA: fator único para os resultados apresentados na planilha-modelo (item 1).

Anova: fator único						
RESUMO						
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Linha 1	7	85,5	12,21429	0,271429		
Linha 2	7	83,7	11,95714	0,399524		
Linha 3	7	82,6	11,8	0,246667		
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,612381	2	0,30619	1,001038	0,387059	3,554557
Dentro dos grupos	5,505714	18	0,305873			
Total	6,118095	20				





# Índice de Tabelas e Quadros

<b>Tabela 2.1.</b> Parâmetros de validação comumente necessários conforme o tipo de ensaio. ....	25
<b>Tabela 2.2.</b> Avaliação da seletividade. ....	27
<b>Tabela 2.3.</b> Verificações para estabelecer a faixa de trabalho e faixa linear. ....	29
<b>Tabela 2.4.</b> Procedimento para obtenção do limite de detecção. ....	32
<b>Tabela 2.5.</b> Procedimentos para obtenção do limite de quantificação (LQ). .	34
<b>Tabela 2.6.</b> Fatores a serem estudados na verificação de robustez. ....	35
<b>Tabela 2.7.</b> Procedimentos para a obtenção de estimativas de precisão intralaboratorial. ....	41
<b>Tabela 2.8.</b> Repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. ....	41
<b>Tabela 2.9.</b> Concentração média do analito na matriz e o desvio-padrão da reprodutibilidade. ....	43
<b>Quadro 4.1.</b> Valores do teor de proteína para as amostras de mortadela e de farinha de soja analisada em condições de repetibilidade. ....	54
<b>Quadro 4.2.</b> Teores de proteína para as amostras de mortadela e de farinha de soja analisadas em condições de reprodutibilidade (precisão intermediária). ....	55
<b>Tabela 4.1.</b> Valores dos testes utilizados para a avaliação da exatidão do método de proteína em amostra de mortadela e de farinha de soja. ...	58
<b>Tabela 4.2.</b> Fator de Conversão de Nitrogênio em Proteína para o método de Kjeldahl. ....	64
<b>Quadro 5.1.</b> Resultados de umidade obtidos pelo método gravimétrico em farinha de soja e mortadela analisada em condições de repetibilidade. ....	73
<b>Quadro 5.2.</b> Teores de umidade para as amostras de mortadela e de farinha de soja analisadas em condições de reprodutibilidade (precisão intermediária). ....	74
<b>Tabela 5.1.</b> Valores dos testes utilizados para a avaliação da exatidão do método de umidade em amostra de mortadela e de farinha de soja. ....	76

<b>Quadro 6.1.</b> Repetibilidade para os resultados de cinzas em farinha de soja e mortadela.....	84
<b>Quadro 6.2.</b> Reprodutibilidade para os resultados de cinzas em farinha de soja e mortadela. ....	85
<b>Tabela 6.1.</b> Valores dos testes utilizados para a avaliação da exatidão do método de cinzas em amostra de mortadela e de farinha de soja. ....	86
<b>Tabela 6.2.</b> Tipos de minerais que podem ser perdidos por volatilização em função da temperatura usada na calcinação. ....	88
<b>Quadro 7.1.</b> Repetibilidade para os resultados de gordura total em farinha de soja e mortadela. ....	94
<b>Quadro 7.2.</b> Teor de gordura total para as amostras de mortadela e de farinha de soja analisadas em condições de reprodutibilidade (precisão intermediária).....	95
<b>Tabela 7.1.</b> A exatidão dos resultados da análise de gordura total para as matrizes farinha de soja e mortadela. ....	96
<b>Quadro 8.1.</b> Repetibilidade (A) e Reprodutibilidade (B) para os resultados de fibra alimentar em farinha de soja. ....	108
<b>Quadro 8.2.</b> Cálculo da exatidão para os resultados de FAT em farinha de soja .....	110

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> <i>Analytical Quality Assurance Cycle (AQAC)</i> (Olivares, Antunes, 2012) .....	20
<b>Figura 4.1.</b> Fluxograma de determinação de proteína em farinha de soja e mortadela .....	53
<b>Figura 5.1.</b> Fluxograma da marcha analítica para determinação de umidade em farinha de soja e mortadela .....	72
<b>Figura 6.1.</b> Fluxograma de determinação de cinzas nas duas matrizes. ....	83
<b>Figura 7.1.</b> Fluxograma de determinação de gordura total nas duas matrizes. ....	93
<b>Figura 8.1.</b> Fluxograma de determinação de Fibra Alimentar em Farinha de Soja .....	105