



A importância da avaliação do desempenho de uma metodologia analítica: a avaliação da exatidão na quantificação de niacina em alimentos

Cristina Flores, Maria da Graça Dias, Mariana Santos

cristina.flores@insa.min-saude.pt

Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

Introdução

A rotulagem dos produtos alimentares destina-se a garantir que os consumidores disponham de informação completa sobre o conteúdo e a composição destes produtos, a fim de proteger a sua saúde e os seus interesses. Assim, informações incorretas no rótulo podem prejudicar a saúde do consumidor e perturbar a confiança dos consumidores e profissionais da área da saúde, os quais adotam o rótulo como uma referência para estabelecer dietas e recomendações alimentares para os seus pacientes.

Neste sentido, a avaliação do desempenho de uma metodologia analítica é fundamental para determinar a qualidade dos resultados obtidos quer em termos de exatidão quer em termos da incerteza desse resultado.

No âmbito da avaliação nutricional dos alimentos, o Laboratório de Química do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge tem vindo, desde 2009, a submeter para acreditação, diversas metodologias analíticas para quantificação de vitaminas. Todo este processo visa a obtenção de dados fiáveis e rastreáveis relativos, nomeadamente, ao teor vitamínico dos diferentes alimentos, de modo a poderem integrar a rotulagem alimentar, a Tabela de Composição de Alimentos, e participarem em estudos de nutrição.

Niacina ou vitamina B3 são designações que incluem dois compostos com atividade vitamínica semelhante: o ácido nicotínico e a nicotinamida.

Esta vitamina é indispensável para a biossíntese dos nucleótidos de piridina, NAD(H) e NADP(H), que desempenham um papel fundamental como coenzimas em reações de oxidação-redução, em diversas vias metabólicas.

As principais fontes alimentares de niacina são a carne e o peixe, a levedura de cerveja, as sementes de girassol e os amendoins. A vitamina B3 também existe em doses elevadas nos cereais, sobretudo no farelo (tegumento das sementes, parte externa do grão ou semente). Nas plantas ocorre principalmente como ácido nicotínico (AN) ligado a proteínas dependendo a sua biodisponibilidade do modo de preparação dos alimentos. Nos tecidos animais a vitamina encontra-se geralmente na forma de Nicotinamida (Nic) na Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD) ou Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato (NADP).

Objetivo

Este trabalho teve como objetivo a avaliação da exatidão dos resultados obtidos com um método normalizado para a quantificação de niacina e a estimativa do valor da incerteza associada a esses resultados. A precisão foi avaliada em matrizes de quatro grupos alimentares: leguminosas, cereais, laticínios e peixe.

Material e métodos

A metodologia analítica em estudo foi um método de cromatografia líquida de alta resolução, baseado na norma europeia EN 15652:2009, que permite determinar o teor de niacina a partir da quantificação dos dois vitâmeros que constituem esta vitamina, AN e Nic, com um limite de quantificação de 0,25 mg/100 g para cada um deles.

Para o estudo de precisão foram selecionadas cinco matrizes diferentes – amendoins torrados, ervilhas cozidas, farelo de trigo, leite em pó e atum em conserva - que foram testadas em triplicado, em quatro ensaios independentes.

Os desvios padrão da repetibilidade (S_r) e da precisão intermédia (S_{P_i}) foram calculados através da ANOVA ($p < 0,05$) e, a partir destes, calcularam-se os limites de repetibilidade para duas réplicas ($r = 2.8 * S_r$) ou para dois ensaios independentes ($P_i = 2.8 * S_{P_i}$).

artigos breves_ n. 13

A veracidade foi avaliada a partir dos Z-scores obtidos em cinco materiais de referência; quatro amostras de cereais de pequeno-almoço do programa de avaliação externa da qualidade FAPAS (2160, 2166, 2172 e 2176) e um material de referência certificado NIST, fórmula infantil/adulto 1849.

A estimativa da incerteza dos resultados obtidos a partir deste método foi feita com base numa abordagem intralaboratorial, calculando a incerteza combinada (μ_C) a partir da raiz quadrada da adição quadrática de μ_P (incerteza associada à precisão) e μ_V (incerteza associada à veracidade). Para o cálculo da incerteza expandida foi aplicado um fator de cobertura de 2 à μ_C .

A μ_P foi calculada a partir dos dados obtidos no estudo de precisão, tendo sido testada a homocedasticidade dos resultados obtidos, nas diferentes matrizes, ($p=0,01$) para avaliar a possibilidade de considerar o desvio padrão ponderado como o valor da incerteza padrão associada à precisão. A μ_V foi calculada a partir dos valores obtidos na quantificação do material de referência FAPAS 2166 ($U=14,2\%$, $k=2$), que foi testado em cinco ensaios realizados em condições de precisão intermédia. Esta abordagem pretendeu incluir todas as fontes de incerteza do método. A veracidade foi avaliada a partir dos Z-score obtidos com estes materiais. Adicionalmente foi calculada U para as matrizes individuais.

_Resultados

Os valores obtidos para r e Pi variaram, entre 0,05 e 1,46 para r, e, entre 0,14 e 3,50 para Pi (tabela1), e, todos os valores de | Z-score | obtidos para as amostras dos materiais de referência foram <2 (gráfico 1).

Tabela 1: Dados de precisão (mg/100 g).

	Repetibilidade		Precisão intermédia		
	n = 4 (dias) x 3 (réplicas)				
	S_r	r	\bar{x}	S_{Pi}	Pi
Amendoins	0,52	1,46	13,4	1,25	3,4
Ervilhas	0,02	0,66	0,59	0,05	1,66
Farelo de trigo	0,23	0,05	18,2	0,78	0,14
Leite em pó	0,02	0,64	0,73	0,6	2,17
Atum	0,24	0,05	9,5	0,6	0,16

\bar{x} – Concentração média em niacina S_r – Desvio padrão da repetibilidade
r – limite de repetibilidade S_{Pi} – Desvio padrão da precisão intermédia
Pi – limite de precisão

Uma vez que a homogeneidade de variância dos valores de concentração em niacina (gráfico 2) não se verifica, considerou-se o maior desvio padrão relativo obtido como valor de μ_P . O valor estimado para μ_V foi 7,5% e 19% para U. O valor de U para as matrizes individuais variou entre 16% e 19% (tabela 2).

Gráfico 1: Valores de Z-score obtidos no estudo de veracidade.

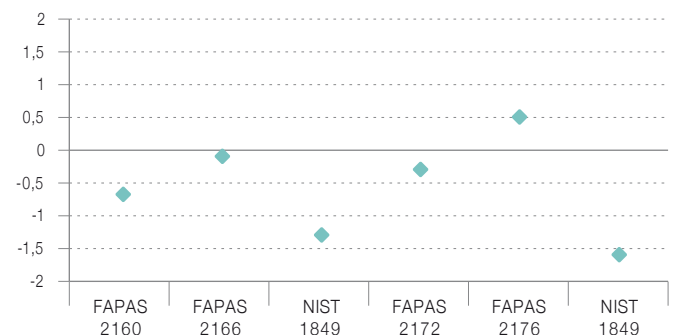


Gráfico 2: Concentração média, em niacina (mg/100 g).

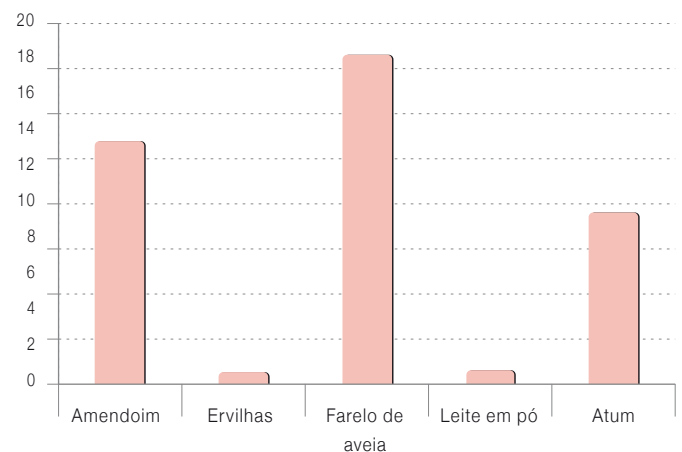


Tabela 2: Estimativa da incerteza obtida a partir do estudo de validação.

	Atum	Ervilhas	Amendoins	Farelo de Aveia	Leite em pó	FAPAS 2166	Method
μ_P %	3,6	4,6	5,6	2,3	4,5	—	5,6
μ_V %	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
μ_C %	8,3	8,8	9,4	7,9	8,8	—	9,4
U %	16,7	17,7	18,7	15,8	17,6	—	18,7

μ_P – incerteza associada à precisão μ_V – incerteza associada à veracidade
 μ_C – incerteza combinada U – incerteza expandida ($k=2$).



artigos breves_ n. 13

_Discussão

Os dados de repetibilidade obtidos neste estudo, para as diferentes matrizes que abrangem uma gama de concentrações de niacina compatível com a utilização do método em rotina, estão de acordo com os da norma europeia EN15652. A avaliação da veracidade através dos materiais de referência revelou um bom desempenho do método/laboratório.

A maior contribuição para a estimativa da incerteza da medição analítica foi a associada à veracidade, devido à elevada incerteza associada ao material de referência (14%).

_Conclusão

A avaliação da exatidão, com matrizes e conteúdos em niacina representativos, demonstrou que o método é adequado ao seu objetivo podendo ser submetido à acreditação por uma entidade externa.

De acordo com os resultados obtidos, os valores da concentração em niacina devem ser reportados com 2 algarismos significativos.

Bibliografia:

- (1) Magnusson B, Örnemark U (eds.). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd ed. Leoben: Eurachem, 2014. [LINK](#)
- (2) ISO 5725-1/6:1994-Accuracy of Measurement Methods and Results Package. Geneva: International Organization for Standardization, 1994.
- (3) Thompson R, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem. 2002;74(5):835-55.
- (4) European Federation of National Associations of Measurement, Testing and Analytical Laboratories. Guide to the Evaluation of Measurement Uncertainty for Quantitative Test Results. Paris: EUROLAB, 2006. (EUROLAB Technical Report nº 1/2006). [LINK](#)
- (5) European Federation of National Associations of Measurement, Testing and Analytical Laboratories. Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation. Paris: EUROLAB, 2007. (EUROLAB Technical Report No. 1/2007). [LINK](#)
- (6) Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories Oslo: NORTEST, 2012. (NORTEST Technical Report 537- Edition 3.1). [LINK](#)
- (7) Barwick VJ, Ellison SLR. Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles: Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data. (VAM Technical Report No. LGC/VAM/1998/088-Version 5.1.).Teddington: LGC Limited, 2000. [LINK](#)
- (8) I.S. EN 15652:2009 - Foodstuffs – Determination of niacin by HPLC. Dublin: National Standards Authority of Ireland, 2009.