



Ana Catarina Nunes Rebelo

Licenciada em Química Aplicada

**Determinação analítica de nitratos em
amostras do estudo da dieta total (TDS) e
contributo para a avaliação da exposição
da população a nitratos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Fitotecnologia Nutricional para a Saúde Humana

Orientadores: Professor Fernando Reboredo & Doutora Elsa
Vasco

Março de 2019

Ana Catarina Nunes Rebelo

Licenciada em Química Aplicada

**Determinação analítica de nitratos em
amostras do estudo da dieta total (TDS) e
contributo para a avaliação da exposição
da população a nitratos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Fitotecnologia Nutricional para a Saúde Humana

Orientadores: Professor Fernando Reboredo & Doutora Elsa
Vasco

Março, 2019

“Determinação analítica de nitratos em amostras do estudo da dieta total (TDS) e contributo para a avaliação da exposição da população a nitratos” Copyright © Ana Catarina Nunes Rebelo, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, por me ter proporcionado esta oportunidade tão enriquecedora. Aos elementos do DAN, Departamento de Alimentação e Nutrição, que me fizeram sentir em casa e que se mostraram sempre disponíveis ajudar.

À minha orientadora pela pessoa espetacular que sempre foi, pelo apoio, amizade, disponibilidade e orientação que me deu, principalmente durante este último mês.

À Dr. Maria João e à Dr. Cristina Flores pela incansável simpatia.

Às minhas colegas de laboratório, Cássia, Regina, Mariana e Mafalda, pela amizade e apoio que me mostraram.

À minha faculdade, e ao Professor Fernando Reboredo, que também me proporcionou esta oportunidade.

Às inúmeras pessoas fantásticas que conheci enquanto trabalhava na Zara, durante o período de estágio, que contribuíram para o meu crescimento pessoal.

Às minhas melhores amigas, Angélica, Daniela, Raquel, Susana, Sofia e André, principalmente pela fiel amizade e apoio durante esta fase decisiva da minha vida. Também quero agradecer aos meus outros amigos, não menos importantes, que sempre se demonstraram disponíveis para mim.

Por último, e não menos importante, à minha Mãe que é o grande pilar da minha vida e que foi quem proporcionou eu ser quem sou hoje, e ao meu irmão, porque além de irmão é um bom amigo, e sempre zelou pelo meu sucesso.

A todas estas pessoas e às outras que me acompanharam nesta longa caminhada, OBRIGADA.

Resumo

Os nitratos fazem parte da dieta humana e embora não sejam aparentemente tóxicos, consumidos em excesso podem ser prejudiciais à saúde, daí a importância da avaliação da exposição a estes compostos.

Este trabalho teve como objetivo a execução de algumas etapas (repetibilidade, precisão intermédia e exatidão) de validação do método de HPLC para determinação do teor de nitratos e a análise das amostras do projeto TDSExposure. A estabilidade da curva de calibração e a repetibilidade e linearidade do injetor foram também alvo de estudo.

Um teste *t-student* demonstrou a estabilidade da curva (até 7 dias). A repetibilidade do injetor cumpriu o coeficiente de variação de 5% e a linearidade comprova a possibilidade de utilizar o injetor no intervalo de 10-200 µL.

Os resultados dos ensaios de repetibilidade, de precisão intermédia e de exatidão demonstraram que o método é preciso e exato.

O método foi aplicado com sucesso à análise de 127 amostras, uma amostra apresentou um valor considerado elevado (>500mg/kg), 52 revelaram valores entre 10-160 mg/kg e, 74, teores inferiores aos LOD e LOQ.

Este estudo contribuiu para a análise de cerca de 50% das amostras do estudo TDS, e para a avaliação da exposição, da população portuguesa, a nitratos.

Palavra-Chave: TDSExposure; HPLC; Validação do Método; Nitratos; População Portuguesa;

Abstract

Nitrates are part of the human diet and although they are not apparently toxic, consumed in excess can be harmful to health, that's why it's important to evaluate the exposure to these compounds.

The aim of this work was to perform some steps (repeatability, intermediate precision and accuracy) of validation of the HPLC method to determine nitrate content and the analysis of the TDSExposure project samples. The stability of the calibration curve and the repeatability and linearity of the injector were also studied.

A t-student test demonstrated the curve stability (up to 7 days). The repeatability of the injector complied with 5% of variation coefficient and the linearity proves the possibility of using the injector in 10 to 200 μL range.

The results of repeatability, intermediate precision and accuracy tests have demonstrated that the method is accurate and exact.

The method was successfully applied to the analysis of 127 samples, one sample presented a high value ($> 500\text{mg/kg}$), 52 showed values between 10-160 mg/kg and 74, lower levels than LOD and LOQ.

This study contributed to the analysis of about 50% of the samples from the TDS study and to the evaluation of the Portuguese population to nitrates exposure

Keywords: TDSExposure; HPLC; Validation of method; Nitrates; Portuguese Population;

Índice

Resumo.....	IX
Abstract.....	XI
Índice de Figuras.....	XVII
Abreviaturas	XXI
1. Enquadramento do Tema.....	1
2. Introdução	3
2.1. Nitratos e Nitritos	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.1.1. Composição química	4
2.1.1.2. Aditivo Alimentar.....	5
2.1.2. Ciclo de Azoto.....	6
2.1.3. Azoto como Fertilizante.....	8
2.1.4. Vias de Exposição	9
2.1.5. Fatores que influenciam os níveis de nitratos nos vegetais e nas águas	11
2.1.6. Efeitos na saúde.....	14
2.1.7. Relação entre o Risco/Benefício.....	16
2.2. Legislação.....	17
2.3 Estudos da Dieta Total (TDS)	19
2.3.1. FoodEx2.....	19
2.4. Metodologia Analítica.....	20
2.4.1. Fundamentos de HPLC	20
2.4.2. Equipamento do HPLC.....	21
2.4.3. Diferentes métodos de separação	22
2.4.3.1. Cromatografia de fase normal (NP-HPLC).....	22
2.4.3.2. Cromatografia de fase inversa (RP-HPLC).....	22
2.4.3.3. Alternativa ao HPLC	22
2.4.4. Validação do Método.....	23
2.4.4.1. Especificidade e Seletividade	23
2.4.4.2. Gama de trabalho.....	23
2.4.4.3. Linearidade.....	24
2.4.4.4. Sensibilidade	25
2.4.4.5. Limites Analíticos (LOQ e LOD).....	26
2.4.4.6. Precisão	27
2.4.4.7. Repetibilidade.....	27
2.4.4.8. Reprodutibilidade.....	28
2.4.4.9. Precisão intermédia.....	28

2.4.4.10. Recuperação	28
2.4.4.11. Exatidão	29
2.4.4.12. Incerteza.....	30
2.4.5. Controlo de Qualidade Interno	31
2.4.5.1. Repetibilidade e Linearidade do Injetor.....	31
3.Objetivos do Trabalho	33
4. Parte Experimental	35
4.1 Equipamento e Material	35
4.2 Reagentes	36
4.3 Soluções.....	36
4.4 Amostras.....	36
4.5. Procedimento Experimental	37
4.5.1. Preparação das soluções.....	37
4.5.1.1. Tampão fosfato de potássio 0,045 M pH3 (fase móvel)	37
4.5.1.2. Solução de bórax saturada	37
4.5.1.3. Solução de Carrez I.....	37
4.5.1.4. Solução de Carrez II	37
4.5.2. Preparação das soluções padrão de calibração	38
4.5.2.1. Solução de padrão de referência	38
4.5.2.2. Solução de padrão de controlo	38
4.5.3. Preparação das amostras	38
4.5.4. Condições Cromatográficas.....	40
4.5.5. Identificação e quantificação do teor de analito	40
4.5.6. Critério de aceitação dos resultados	41
4.5.7. Processo de validação do método.....	42
4.5.8. Controlo Qualidade Interno	43
4.5.9. Estudos de estabilidade	43
5. Resultados e Discussão	44
5.1. Critérios de Validação	44
5.1.1. Precisão	45
5.1.2. Exatidão	46
5.2. Controlo de Qualidade Interno	47
5.2.1. Repetibilidade e Linearidade do Injetor	47
5.3. Estudo da Estabilidade da Curva	49
5.4. Análise das Amostras	52
5.5. Discussão Bibliográfica	65
Conclusão	67

Referências Bibliográficas	69
Anexos	77
Anexo I - Tabela de grupos de alimentos, baseado no sistema de classificação FoodEx2.....	78
Anexo II – Documento do software Empower (<i>LC Calibration Report</i>) que mostra os resultados da Curva de Calibração (Resíduos - %, r e r ²).....	79
Anexo III – Folha para cálculo da concentração de nitratos, em mg/kg, das amostras do estudo da repetibilidade.....	81
Anexo IV - Folha para cálculo do desvio padrão relativo da repetibilidade (RSDr).....	82
Anexo V - Folha para cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (RSD _R).	83
Anexo VI – Folha de Cálculo da concentração de Nitratos (mg/kg).....	84
Anexo VII – Cromatogramas de amostras analisadas.....	85
Anexo VIII – Artigo publicado no Boletim Epidemiológico do INSA, em 2018.	86

Índice de Figuras

Figura 2.1- Estrutura química do Nitrato (A) e do Nitrito (B) em 2D e 3D.....	5
Figura 2.2- Ciclo do Azoto.....	7
Figura 2.3- Tabela de classificação dos produtos hortícolas conforme a sua tendência para acumular nitratos (mg/kg material fresco).....	10
Figura 2.4- Mecanismos de transformação e transporte dos nitratos endógenos e exógenos dentro do corpo humano.....	13
Figura 2.5 – Tabela com estudos publicados que evidenciam sobre a favor e contra o consumo de nitratos estar relacionado com o cancro gastrointestinal.....	15
Figura 2.6- Esquema das componentes do sistema de HPLC.....	21
Figura 4.1 - Tabela de reagentes usados e as respetivas especificações.....	37
Figura 4.2- Esquema do procedimento para a preparação das amostras.....	40
Figura 5.1- Cromatograma do primeiro ponto da curva de calibração (1 µg/ml).....	45
Figura 5.2 - Tabela que apresenta o desvio padrão relativo da repetibilidade (RSD _r %) e da precisão intermédia (RSD _R %), calculados para as três amostras testadas.....	46
Figura 5.3- Tabela representativa do resultado ao teste interlaboratorial FAPAS.....	47
Figura 5.4- Tabela do cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação, das áreas dos picos em função do número de injeções.....	47
Figura 5.5- Tabela com as áreas do pico, em função dos volumes injetados, da solução padrão de 4 µg/mL e correspondente média.....	48
Figura 5.6 – Gráfico correspondente à respetiva regressão linear para obtenção do coeficiente de determinação (r^2), baseado na relação entre o volume injetado e a área do pico (sinal obtido no cromatograma).....	48
Figura 5.7- Gráfico correspondente à respetiva regressão linear da relação entre as áreas dos picos e a concentração das soluções da curva de calibração, preparadas no primeiro dia, a partir da mesma solução stock.....	50
Figura 5.8- Gráfico correspondente à respetiva regressão linear da relação entre as áreas dos picos e a concentração das soluções da curva de calibração, preparadas no próprio dia da injeção.....	50
Figura 5.9 – Tabela correspondente às áreas dos picos, da solução do extremo máximo da gama de trabalho (10 µg/ml), das soluções preparadas no dia 1 e dia 7, preparadas no próprio dia da injeção e preparadas no primeiro dia.....	50

Figura 5.10 - Tabela com o resultado obtido do estudo da distribuição <i>t-student</i>	50
Figura 5.11 - Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 2, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).....	52
Figura 5.12 - Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 3, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).....	52
Figura 5.13 - Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 4, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).....	53
Figura 5.14 – Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 6, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg)	53
Figura 5.15 - Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 14, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg)	53
Figura 5.16 - Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 15, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg)	53
Figura 5.17 - Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 5, respetivo número de tomas, resultado final (mg/kg) e taxa de recuperação (%)......	54
Figura 5.18 – Gráfico representativo dos teores de nitrato nas amostras quantificáveis do grupo 5	56
Figura 5.19 – Cromatograma da amostra “Salada de Alface e Tomate”.....	56
Figura 5.20 - Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 7, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).....	57
Figura 5.21 - Gráfico representativo dos teores de nitrato nas amostras quantificáveis do grupo 7.....	57
Figura 5.22 – Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 9, respetivo número de tomas, resultado final (mg/kg) e taxa de recuperação (%)......	58

Figura 5.23 - Gráfico representativo dos teores de nitrato nos frutos, grupo 9, nas diferentes estações do ano.....	59
Figura 5.24 – Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 11, respetivo número de tomas, resultado final (mg/kg) e taxa de recuperação (%).	60
Figura 5.25 - Gráfico representativo dos teores de nitrato nas amostras quantificáveis do grupo 11.....	61
Figura 5.26 – Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 13, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).	62
Figura 5.27 - Gráfico representativo dos teores de nitrato nas amostras quantificáveis do grupo 13.....	62
Figura 5.28 – Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 16, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).	63
Figura 5.29 - Gráfico representativo dos teores de nitrato nas amostras quantificáveis do grupo 16.....	63
Figura 5.30 – Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 18, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).	64
Figura 5.31 - Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 20, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).	64
Figura III.I – Cromatograma da amostra da salada de alface e tomate, apresentada no tempo de retenção= 5,664min.....	85
Figura III.II – Cromatograma da amostra da salada de alface e tomate com adição de padrão, apresentada no tempo de retenção= 5,657min.....	85

Abreviaturas

ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
BCR	<i>Bureau Communautaire de Références</i>
CCAH	Comité Científico da Alimentação Humana
CE	Comissão Europeia
CEE	Comunidade Económica Europeia
CCF	Cromatografia de Camada Fina
CG	Cromatografia Gasosa
CV	Coeficiente de Variação
CV_r	Coeficiente de Variação de Repetibilidade
CV_R	Coeficiente de Variação de Reprodutibilidade
DAN	Departamento de Alimentação e Nutrição
DDA	Dose Diária Admissível
DACR	Direção de Avaliação e Comunicação dos Riscos na Cadeia Alimentar
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> / Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
EUA	<i>United States of America</i> / Estado Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> / Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FAPAS	<i>Food Analysis Performance Assessment Scheme</i>
FoodEx2	<i>Food Classification and Description System</i>
Hb	Hemoglobina
HM	<i>Health Monitoring</i> / Monitoramento da Saúde
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> / Organização International de Normalização
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> / Agência Internacional de Pesquisa do Cancro

INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> / União Internacional de Química Pura e Aplicada
IRMM	<i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> / Comité Conjunto de Peritos para os Aditivos Alimentares da FAO e OMS
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
LSA	Laboratório de Segurança Alimentar
NP-HPLC	<i>Normal Phase High Performance Liquid Chromatography</i> / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase normal
MRC	Material de Referência Certificado
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
MetHba	Metahemoglobina
N	Nitratos
NO	<i>Nitric oxide</i> / Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
RA	<i>Risk Assessment</i> / Avaliação de risco
RP-HPLC	<i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i> / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase inversa
RSD	<i>Residual Standard Deviation</i> / Desvio Padrão Relativo
RSD_r	<i>Residual Standard Deviation of Repeatability</i> / Desvio Padrão Relativo de Repetibilidade
RSD_R	<i>Residual Standard Deviation of Reproducibility</i> / Desvio Padrão Relativo de Reprodutibilidade
RELACRE	Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal
S	Desvio Padrão Absoluto
SCF	<i>Scientific Committee on Food</i> / Comité Científico para a Alimentação Humana
TDS	<i>Total Diet Studies</i> / Estudos de Dieta Total

TR	Taxa de recuperação
UE	União Europeia
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i> / Organização Mundial da Saúde

1. Enquadramento do Tema

Atualmente, o estado de saúde da população é um fator que cada vez mais é determinado pela alimentação. A OMS (Organização Mundial da Saúde) antevê que o número de doenças ligadas à alimentação está a aumentar de forma drástica (Kretchmer, 1994). A nutrição é uma ciência que cada vez mais está relacionada com a nossa saúde alimentar, isto é, a maioria das doenças existentes em pleno século XXI são consequências de maus hábitos alimentares ao longo de toda a vida (WHO, 2015). Os desequilíbrios na alimentação em relação à ingestão de nutrientes que compõem as características da dieta, tanto em excesso como em défice, trazem efeitos colaterais à saúde, não só imediatos, mas também a longo prazo (Viana, 2014).

Durante este projeto, houve o objetivo de estudar os níveis de nitratos em algumas matrizes alimentares, com o intuito de perceber o que realmente se anda a comer. Os nitratos, são compostos que são encontrados de forma natural em diversos alimentos, no entanto, também são aditivos alimentares, principalmente em produtos cárneos. A sua principal forma de consumo é através da ingestão dos produtos hortícolas, nos quais estão presentes. Embora estes apresentem um papel fundamental na saúde humana, quando consumidos em grandes quantidades poderão se tornar prejudiciais.

O projeto *TDSExposure* foi um projeto à escala europeia e financiado pela União Europeia, através do qual se pretendeu criar uma rede de estudos de dieta total (TDS) e melhorar e harmonizar a monitorização da exposição a substâncias químicas benéficas e prejudiciais presentes nos alimentos ingeridos diariamente. Os estudos TDS são bastante importantes para a saúde e têm como objetivo cobrir a totalidade da dieta alimentar de forma a quantificar a ingestão diária aproximada de nutrientes e a exposição a contaminantes. Em Portugal, tratou-se de um projeto pioneiro, uma vez que nunca tinha sido realizado um estudo TDS.

No âmbito deste projeto, com o objetivo de cobrir a dieta alimentar, foram obtidas amostras alimentares, tal como consumidas, para quantificação dos nutrientes e contaminantes para posterior avaliação da exposição.

O estudo das amostras do TDS foi realizado através de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), com deteção UV (ultra-violeta), que se encontra implementado e acreditado no Laboratório de Química do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), para a determinação de nitratos.

2. Introdução

2.1. Nitratos e Nitritos

2.1.1 Generalidades

O azoto é um elemento essencial para todos os organismos da Terra, porém, também é o que restringe a produtividade das lavouras agrícolas, quando a sua limitação ou ausência (Villalba et al., 2014). Em pleno século XX, ocorreu um aumento drástico da produção de compostos azotados, devido não só à utilização de fertilizantes, mas também como consequência da sua formação como subproduto da combustão de combustíveis fósseis (Powelson et al., 2008; IARC, 2010; Monteiro, 2014). Nem todo o nitrato que é usado como fertilizante, é absorvido pelas plantas, o que leva a que essa percentagem não absorvida sofra posteriores transformações, através de processos físicos, como a volatilização, processos químicos, como a fixação, precipitação e hidrólise, e ainda microbiológicos, como é o caso da nitrificação e desnitrificação (Villalba et al., 2014).

Entre os sais de nitrato e nitrito os mais relevantes são, o nitrato de sódio (NaNO_3), o nitrato de amónio (NH_4NO_3), o nitrato de potássio (KNO_3), o nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) e o nitrato de magnésio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$). Estes sais têm um papel muito importantes em diversas funções, o nitrato de amónio é dos fertilizantes mais utilizados no mundo e ainda é utilizado na produção de explosivos, o nitrato de potássio e sódio são utilizados como fertilizantes, inseticidas, na produção de fósforos, fogo-de-artifício, explosivos e até pólvora. Por outro lado, os compostos de nitrito mais conhecidos são, o nitrito de sódio (NaNO_2) e o nitrito de potássio (KNO_2). Tantos os sais de nitrato como de nitrito são abundantemente usados como aditivos alimentares, principalmente em indústrias de carnes fumadas (Monteiro, 2014; U.S Environmental Protection Agency, 2007).

O Nitrato não é considerado tóxico, contudo, os seus metabolitos (nitrito, óxido nítrico e compostos N-nitrosos) fazem com que o nitrato seja alvo de regulação devido às suas implicações potencialmente adversas para a saúde (EFSA, 2008; União Europeia, 2011). Algumas pesquisas demonstraram, no entanto, que a conversão de nitrato em nitrito no trato gastrointestinal acarreta uma função benéfica importante no estômago, havendo também outros metabolitos que apresentam funções fisiológicas/farmacológicas importantes (EFSA, 2016; World Health Organization, 1995). Muitas das vezes os regulamentos só são baseados em informações sobre os efeitos negativos dos nitratos, não dando ênfase aos efeitos benéficos. Vários estudos (em animais) demonstraram que os riscos para o homem, não eram fundamentados (McKnight et al., 2009).

Apesar desta controvérsia, a legislação comunitária estabelece referências para o consumo máximo de nitratos e nitritos (Monteiro, 2014). *The Scientific Committee on Food* (SCF) determinou que a dose diária admissível (DDA) de nitratos seria de 3,7 mg/kg de peso corporal/dia e a de nitritos 0,06 mg/kg de peso corporal/dia. O Regulamento (EU) Nº1258/2011 da Comissão, de 2 de dezembro que altera o anterior documento (regulamento (CE) Nº1881/2006 da comissão, de 19 de Dezembro) fixa os teores máximos de nitratos e nitritos presentes nos géneros alimentícios (Comissão Europeia, 2006; União Europeia, 2011).

Em Portugal existem Autoridades que são responsáveis pela avaliação da Segurança Alimentar, a ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica), é uma delas, e tem a função de avaliar os riscos que poderão afetar os consumidores. O trabalho da ASAE é realizado através de algumas unidades orgânicas nucleares, entre elas, a Direção de Avaliação e Comunicação dos Riscos na Cadeia Alimentar (DACR) e o Laboratório de Segurança Alimentar (LSA) (Ministérios das Finanças e da Administração Pública e da Economia e da Inovação, 2009).

Dados concretos dizem que o consumo médio de nitratos varia entre 52-156 mg/dia, enquanto que a ingestão média diária de nitritos é inferior a 2 mg por pessoa. Portanto, assumindo que uma pessoa com um peso corporal de 60 kg ingere 100 g de vegetais frescos com uma concentração de 2500 mg/kg de nitratos, automaticamente excede a Dose Diária Admissível (DDA) (EFSA, 2008; Silva, 2014). Contudo, “O Comité Científico da Alimentação Humana (CCAH), no seu parecer de 22 de setembro de 1995, declarou que a ingestão total de nitratos é habitualmente bastante inferior à dose diária admissível (DDA) de 3,7 mg/kg de peso corporal/dia. Recomendou, contudo, a continuação dos esforços para reduzir a exposição aos nitratos através dos alimentos e da água” (Comissão Europeia, 2006).

2.1.1.1. Composição química

Os nitratos e os nitritos existem sob a forma orgânica e inorgânica. A estrutura química do ião nitrato (NO_3^-) apresenta-se com um átomo de azoto no centro e três de oxigénio nas extremidades, sendo uma das ligações dupla, o que origina uma estrutura trigonal planar (figura 2.1). Já o ião nitrito (NO_2^-), contem igualmente um grupo funcional nitro, mas numa das ligações, o átomo de oxigénio é substituído por um grupo R (PubChem, 2004), apresentando-se com uma estrutura angular (figura 2.1), devido à repulsão existente nos pares eletrónicos no nível de valência. O nitrato apresenta-se como a base conjugada do ácido nítrico, um ácido forte ($\text{pK}_a = -1.3$), que é totalmente ionizado em solução aquosa (PubChem, 2004; Canadian Council of Ministers of the Environment, 2012) por outro lado, o ião nitrito é uma base conjugada do ácido nitroso, um ácido fraco ($\text{pK}_a = 3.4$), que, em contato com a água, no seu estado de oxidação normal, é automaticamente convertido em nitrato. O ião nitrito é um produto da oxidação da amónia ou da redução dos nitratos, tendo origem química ou biológica, respetivamente.

A forma orgânica dos nitratos e nitritos, é na maioria sintetizada em laboratório, essencialmente para uso medicinal, enquanto que a forma inorgânica, ocorre naturalmente. O ião nitrato é a forma mais estável dos complexos oxidados de azoto, já o nitrito, é bastante reativo, oxidando com uma enorme facilidade o Fe^{2+} da hemoglobina para Fe^{3+} e aminas primárias (PubChem, 2004; IARC, 2018).

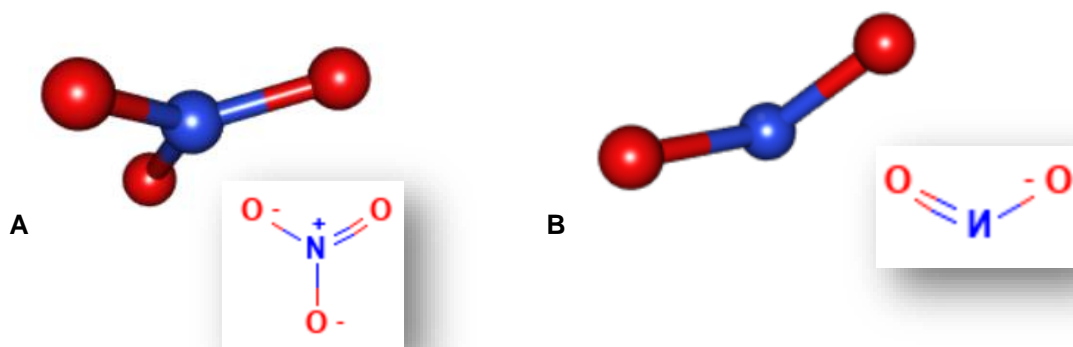


Figura 2.1- Estrutura química do Nitrato (A) e do Nitrito (B) em 2D e 3D -
Retirado de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nitrate#section=3D-Conformer> &
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/946#section=3D-Conformer>.

2.1.1.2. Aditivo Alimentar

De acordo com o Regulamento (CE) Nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008 “Os aditivos alimentares são substâncias que não são consumidas habitualmente como géneros alimentícios em si mesmas, mas que são intencionalmente adicionadas aos géneros alimentícios para atingir determinado objetivo tecnológico descrito no presente regulamento, como, por exemplo, a conservação dos géneros alimentícios” (União Europeia, 2008).

Os sais de nitrato e nitrito são compostos inorgânicos, que se apresentam de cor branca e cristalina, são normalmente de origem sintética, contudo, também existem na sua forma natural como minerais. São usados como conservantes e fixadores de cor, em produtos cárneos (Silvestre & Lidon, 2007). Estes aditivos têm um grande poder de inibição do crescimento do *Clostridium botulinum*, evitando eventos de botulismo (Silvestre & Lidon, 2007; Jornal Oficial da União Europeia, 2011), uma intoxicação causada pela ingestão de alimentos contaminados pelo *Clostridium botulinum* (ASAE, 2005).

De acordo com o Decreto-Lei n.º 33/2008 de 25 de fevereiro de 2008, em relação à utilização dos sais de nitrito e nitrato como aditivo alimentar no fabrico de produtos à base de carne, tem-se que: os produtos tradicionais à base de carne curada por imersão e a seco, são os géneros alimentícios a que se pode adicionar a maior quantidade de Nitrato de potássio (E252) com a finalidade de conservar, e sem qualquer tipo de restrições; outros tipos de produtos tradicionais à base de carnes curadas (*salami*, presunto, *bacon* fumado), pode-se adicionar exatamente a mesma quantidade de Nitrato de potássio (E252), contudo, não se pode adicionar em simultâneo os aditivos alimentares E249 (Nitrito de potássio) e E250 (Nitrito de sódio) (Ministério Público, 2008).

Analisando o Decreto-Lei n.º 33/2008 de 25 de Fevereiro, a tabela 5 do Anexo I, através dos diferentes tipos de alimentos e pelos quatro aditivos analisados, consegue-se detetar que o Nitrato de potássio (KNO_3) é o que se pode adicionar em maiores quantidades, já o nitrito de sódio ($NaNO_2$) é o que se pode adicionar em menores quantidades, independentemente do género alimentício (Ministério Público, 2008).

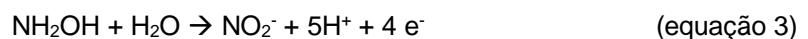
2.1.2. Ciclo de Azoto

O azoto molecular (N_2) é um elemento químico, no estado gasoso, bastante abundante, constituindo quase 80% da atmosfera terrestre. Este elemento químico, além de abundante, também é termodinamicamente estável, não sendo utilizado diretamente como fonte de azoto nesta sua forma (Militão, 2004).

O processo em que o azoto molecular se converte em azoto biologicamente disponível é denominado de fixação do azoto (equação 1) (figura 2.2), podendo ser induzido (em indústrias de fertilizantes) ou ocorrendo naturalmente através das plantas (Johnson et al., 2005). Contudo, uma vez que o azoto molecular é uma molécula muito estável é muito difícil a realização desta conversão naturalmente, sendo que apenas um pequeno grupo de procariontes tem a capacidade energética suficiente para o fazer. Esta capacidade energética é proveniente de um complexo enzimático (nitrogenase) existente que funciona como um catalisador na redução de azoto em amónia. Algo importante a considerar, é a inibição da nitrogenase pela presença de oxigénio (Bernhard, 2010).



O azoto é o quarto elemento mais comum nos tecidos vivos, a seguir ao carbono, oxigénio e hidrogénio, sendo uma componente essencial nas biomoléculas essenciais (aminoácidos, vitaminas, enzimas, nucleótidos e hormonas). Quando um organismo morre, ocorre a amonificação do azoto orgânico existente nos tecidos. A amonificação é um processo que consiste na libertação do azoto em forma de amónia, devido à sua decomposição por parte dos fungos e bactérias. A amónia libertada é então absorvida pelas plantas, sofrendo posteriormente processos de nitrificação. A nitrificação consiste num processo aeróbio, realizado por um grupo de bactérias (bactérias nitrificantes), começando pela oxidação da amónia em nitrito, através do intermediário hidroxilamina (NH_2OH), através de duas enzimas, amónia monoxigenase (equação 2) e hidroxilamina oxidoreductase (equação 3). Seguindo-se para a oxidação do nitrito em nitrato (equação 4). A nitrificação é um processo essencial, uma vez que, os nitratos são a forma azotada de eleição por parte das plantas (Militão, 2004; Bernhard, 2010).



Contudo, os nitratos (NO_3^-) são íões com carga negativa, o que acontece exatamente em relação às partículas do solo, que, por conseguinte, não formam ligação entre si, levando a que as moléculas de nitrato sejam eliminadas por lixiviação, o que não se verifica com as moléculas de amónia (NH_4^+) (Militão, 2004).

A desnitrificação é outra reação muito importante no ciclo de azoto, que consiste na conversão do nitrato em formas gasosas (óxido de nítrico, óxido nitroso e gás diazoto), sendo o gás de azoto o produto final. Este processo, elimina o azoto bio disponível, sendo uma consequência originada da saturação dos solos (Johnson et al., 2005). Este processo, acarreta algumas vantagens, como é o caso da reciclagem de azoto nos ecossistemas e a manutenção da potabilidade da água (Militão, 2004). Este processo, ao contrário da fixação do azoto, é um processo que ocorre naturalmente com uma maior facilidade. Existem evidências de alguns eucariotas responsáveis pela sua realização.

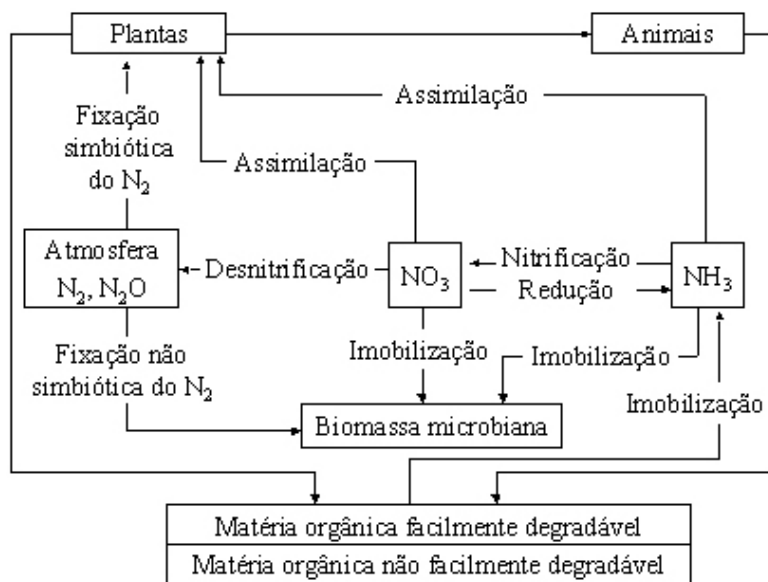


Figura 2.2- Ciclo do Azoto -
Retirado de: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/nitratos.aspx>.

2.1.3. Azoto como Fertilizante

Os Nitratos (NO_3^-) existem de forma natural nas plantas, como consequência do ciclo de azoto, representando 90% da fonte de azoto imprescindível para o crescimento regular das plantas, devido ao seu potencial de acumulação. Sendo desta forma muito utilizado na agricultura como fertilizante, com a função de substituir o uso tradicional do estrume (EFSA, 2008, 2016). Nas atividades agrícolas existe um aumento da necessidade de um crescimento rápido associado a uma boa qualidade, o que não se verifica na maior parte das vezes, originando uma excessiva utilização de fertilizantes azotados. Este uso excessivo tem como consequência o aumento do teor de nitratos nos solos e, por conseguinte, nas plantas (ASAE, 2017).

O azoto é um elemento responsável pela cor verde das folhas, pois entra na constituição da clorofila, pigmento responsável pela cor, essencial para a realização da fotossíntese, e pelo crescimento dos rebentos. O défice deste elemento é facilmente notado, ocorrendo o aparecimento da coloração amarela, começando pelas folhas mais velhas e continuando pela restante planta, levando conseqüentemente à queda prematura das folhas (Arrobas, 2010). Na produção agrícola, ocorre muitas das vezes acumulação de nitratos nas plantas, devido a um excesso da taxa de acumulação em relação à taxa de redução do ião amónio. Contudo, há que ter em atenção que a quantidade de nitratos acumulados nas plantas não é diretamente proporcional ao seu rendimento, assim sendo, sempre que os produtores excedem a quantidade de fertilizante indicado, de forma a que a quantidade de azoto não seja a limitante do processo, só estão a contribuir para uma contaminação dos solos e uma taxa de toxicidade nos alimentos (Cemek et al., 2007).

Os fertilizantes, são produtos químicos que se colocam no solo de forma a aumentar a disponibilidade dos nutrientes. São divididos consoante as suas funções: a de melhorar as características físico-químicas do solo, como se verifica quando se utiliza matérias orgânicas nos solos para aumentar a capacidade de reservas de água e nutrientes, que são denominados de corretivos; e a de melhorar a disponibilidade dos nutrientes para as plantas, denominados de adubos. Existem algumas variedades de adubos, os elementares, que só fornecem à planta um elemento principal (World Health Organization, 1995; PubChem, 2004; Monteiro, 2014), e os adubos compostos, que podem fornecer à planta dois ou três dos elementos/compostos, permitindo assim uma ação mais completa; entre os principais macronutrientes, os mais utilizados pelas plantas, são os azotado, devido ao seu papel crucial no desenvolvimento e reprodução das mesmas (Arrobas, 2010; Silva, 2010). Como fertilizantes, os compostos azotados são usados na sua forma nítrica (NO_3^-) e amoniacal (NH_4^+). Este tipo de fertilização merece uma atenção reforçada, uma vez que, a sua forma nítrica, sendo esta a mais utilizada pelas plantas, consiste numa forma crítica deste elemento, quer pelo seu fácil desaparecimento através da técnica de lixiviação, quer pela sua contaminação de águas superficiais/subterrâneas, caso esta não seja absorvida pelas plantas. Por conseguinte, a utilização deste elemento deve ser realizada através de formas azotadas mais estáveis, por isso, deve-se dar preferência à forma amoniacal deste fertilizante (Arrobas, 2010). Porém, mesmo na forma amoniacal, existe uma enorme facilidade de se converter na sua forma nítrica. Embora já existam tecnologias que facilitem a inibição desta conversão e os desperdícios dos nutrientes, há que ter sempre em atenção a

sua forma de aplicabilidade, ou seja, aplicar sempre em quantidades moderadas e em diversas frações (Hester, 1996).

2.1.4. Vias de Exposição

Existem inúmeros meios de exposição aos nitratos e nitritos, sendo os alimentos a principal via de exposição (80-94%), seguindo-se a água, e pontualmente os produtos cárneos. A contaminação dos solos, da água e dos alimentos pode ser uma consequência da utilização inadequada de fertilizantes azotados, e que, por conseguinte, contamina os alimentos e as águas residuais (Veiga et al., 2009).

O enriquecimento em azoto provoca alterações nos ecossistemas terrestres e aquáticos. Isto verifica-se quando ocorre o escoamento dos nitratos que não são absorvidos pelas plantas para os rios, provocando, um crescimento anómalo de algas associadas a uma falta de oxigenação nas águas costeiras e estuarinas, e uma acidificação dos solos através da deposição de algumas espécies azotadas. Todos estes tipos de contaminações e as suas consequências conduzem a drásticas alterações na diversidade e no número e espécies nos ecossistemas. Todas estas alterações têm indiretamente efeitos negativos na saúde pública, quando existe a produção de NO (óxido nítrico), que contribui para a destruição da camada do ozono (efeito de estufa) permitindo que a radiação UV penetre ao nível do solo, levando muitas das vezes a implicações associadas à pele, como o caso do cancro (Powlson et al., 2008).

Por outro lado, o aumento do impacto ambiental, devido à exposição de compostos reativos azotados (fertilizantes, resíduos de leguminosas, perdas de esterco), obriga à elaboração de práticas de manejo por parte dos agricultores, de forma a que se consiga aproveitar o máximo possível para que não hajam perdas. De acordo com o Despacho n.º 1230/2018, *“A fertilização racional será, pois, uma fertilização por medida, indispensável à obtenção da melhor rendibilidade económica da produção agrícola e à preservação da qualidade do ambiente, nomeadamente a proteção das águas superficiais e das águas subterrâneas contra a poluição (eutrofização), com nutrientes veiculados pelos fertilizantes.”* (Powlson et al., 2008; Gabinetes dos Secretários de Estado do Ambiente e das Florestas e do Desenvolvimento Rural, 2018). Uma vez que uma agricultura sem fertilizantes azotados não é uma opção se os 6,5 bilhões de pessoas e os 9 bilhões (previstos) em 2050 precisarem de ser alimentados (Powlson et al., 2008).

De acordo com a Decisão de Execução (UE) 2018/1928 da Comissão de 6 de dezembro de 2018, que concede uma derrogação solicitada pela Dinamarca nos termos da Diretiva 91/676/CEE do Conselho relativa à proteção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola: *“Os dados sobre a aplicação da Diretiva 91/676/CEE para o período de 2012 a 2015 mostram que, no que diz respeito às águas subterrâneas, 83,4 % dos locais de monitorização apresentam concentrações médias de nitratos inferiores a 50 mg/l e 27,5 % inferiores a 25 mg/l. No que diz respeito às águas superficiais, 99,4 % dos locais de monitorização apresentam concentrações médias de nitratos inferiores a 50 mg/l e em 85,8 % dos locais de controlo as concentrações médias são inferiores a 25*

mg/l. Os dados de monitorização revelam uma tendência estável da concentração de nitratos nas águas subterrâneas e de superfície, em relação ao período de referência anterior (2008 a 2011). Os dados sobre a eutrofização mostram que 25 % dos lagos monitorizados foram classificados em estado elevado/bom e 75 % em estado inferior a bom e que duas das 119 massas de águas estuarinas e costeiras controladas foram classificadas em estado bom” (União Europeia, 2018a).

Já nos Países Baixos, de acordo com a Decisão de Execução (UE) 2018/820 da Comissão de 31 de maio de 2018, que concede uma derrogação solicitada pelos Países Baixos, nos termos da Diretiva 91/676/CEE do Conselho relativa à proteção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola: “nos termos do artigo 10 da Diretiva 91/676/CEE revelam que, no que diz respeito ao período entre 2012 e 2015, cerca de 88 % das estações de controlo das águas subterrâneas nos Países Baixos registavam uma concentração média de nitratos abaixo dos 50 mg/l e que 79 % dessas estações de controlo registavam uma concentração média de nitratos abaixo dos 25 mg/l. Os dados revelam igualmente que, em relação ao período entre 2012 e 2015, 99 % das estações de controlo das águas de superfície nos Países Baixos registavam concentrações médias de nitratos abaixo dos 50 mg/l e que 96 % dessas estações de controlo registavam concentrações médias de nitratos abaixo dos 25 mg/l. Os dados indicam uma tendência estável de redução na concentração de nitratos nas águas subterrâneas e nas águas de superfície comparativamente ao período compreendido entre 2008 e 2011. Não obstante, no período analisado de 2012 a 2015, 60 % das águas doces eram eutróficas, 13 % potencialmente eutróficas e 27 % não eutróficas”(União Europeia, 2018b).

O consumo humano de produtos hortícolas é responsável pela maior exposição a nitratos, entre 72-94%. A figura 2.3, mostra a quantidade de nitratos existentes em alguns hortícolas: os espinafres e a alface estão dentro do grupo que contém uma quantidade “muito alta” de nitratos (>2500 mg/kg), já os espargos e as ervilhas estão no grupo que contém uma quantidade “muito baixa” de nitratos (<200 mg/kg). Estes dados dão-nos informações muito relevantes, quanto ao hortícola que acumula maiores quantidades de nitratos. Dentro das famílias de hortícolas que acumulam maior quantidade de nitratos, temos, a *Brassicaceae*, incluindo a rúcula, o rabanete e a mostarda, a *Chenopodiaceae*, que inclui a beterraba, o espinafre e a acelga, a *Asteraceae* que inclui a alface, a *Apiaceae*, que inclui o aipo e a salsa, e ainda a *Amaranthaceae* que inclui os amarantos (Cemek et al., 2007; Veiga et al., 2009; Monteiro, 2014).

Muito baixo (<200)	Baixo (200-500)	Médio (500-1000)	Alto (1000-2500)	Muito alto (>2500)
Alcachofra	Abóbora	Couve	Aipo vermelho	Agrião
Alho	Brócolos	Couve-Sabóia	Alho francês	Aipo
Batata	Cenoura	Endro	Endívias	Alface
Cebola	Couve-flor	Nabo	Funcho	Espinafre
Cogumelos	Pepino		Rábano	Rabanete
Ervilha			Salsa	Rúcula
Espargos				

Figura 2.3- Tabela de classificação dos produtos hortícolas conforme a sua tendência para acumular nitratos (mg/kg material fresco) (Comissão Europeia, 2006; ASAE, 2017).

2.1.5. Fatores que influenciam os níveis de nitratos nos vegetais e nas águas

Os teores de nitratos dependem de diversos fatores, tendo-se tornado um ponto fulcral em diversos estudos, e verificou-se que a acumulação de nitratos nas plantas depende de fatores genéticos (diversidade e variedade entre espécies), ambientais (alterações atmosféricas, humidade, temperatura, radiação, e o tempo de exposição solar), agrícolas (doses de fertilizantes (disponibilidade do azoto), utilização de herbicidas, quantidade de água no substrato) e até mesmo o armazenamento e processamento dos alimentos após a sua colheita (Shao-Ting et al., 2007; EFSA, 2008; Veiga et al., 2009).

Basta apresentar um genótipo diferente que já é uma razão mais do que suficiente para apresentar níveis de acumulação de nitratos diferentes, como no caso do espinafre. Na planta pode ocorrer uma distribuição de nitratos bastante diversificada, sendo classificado, o pecíolo, como a parte com maior acumulação, e as sementes, como a parte com menor quantidade de nitratos (Shao-Ting et al., 2007).

A época de produção é um parâmetro que influencia imenso a concentração de nitratos nos alimentos. As amostras recolhidas em meados de novembro, altura do ano em que existe pouca exposição solar, e, por conseguinte, uma menor intensidade luminosa, originando uma diminuição da ação fotossintética (ação indispensável para o desenvolvimento da planta e para o gasto dos nitratos), e um aumento da concentração de nitratos nas plantas. Como no caso dos espinafres e da alface iceberg, ou qualquer outra planta, quando cultivados em estufas e ao ar livre, apresentaram diferentes acumulações de nitratos nos seus tecidos, isto deve-se à quantidade de intensidade luminosa aí existente. Existindo mesmo teores máximos de nitratos superiores aquando cultivados em estufas. Isto pode-se dever ao fato de uma menor intensidade luminosa, menor utilização dos nitratos, menor desenvolvimento da planta e, por conseguinte, uma maior acumulação de nitratos (Comissão Europeia, 2006; Veiga et al., 2009; Weightman et al., 2006; União Europeia, 2011; Kanaan & Economakis, 2015; World Health Organization, 2018).

Esta descrito no Regulamento (CE) Nº 1881/2006 Da Comissão de 19 de dezembro de 2006, que *“devido às condições climáticas em determinados Estados-Membros, é difícil garantir que os teores máximos para a alface e os espinafres frescos não sejam ultrapassados”* e que por isso devem *“ser fixados diferentes teores máximos de nitratos consoante a estação do ano”*. Sendo que os teores máximos de nitratos são superiores no período de colheita compreendido entre o dia 1 de outubro e 31 de março, em comparação aos do período de colheita entre 1 de abril e 30 de setembro (Comissão Europeia, 2006).

Por outro lado, temos os fertilizantes, igualmente importantes no conteúdo de nitratos presentes nos tecidos das plantas. Um estudo feito com três diferentes tipos de culturas, hidropónica, convencional e orgânica, mostrou que os produtos hortícolas (alface) cultivados em agricultura biológica tendem a acumular uma menor quantidade de nitratos. Fertilizantes com baixas quantidades de azoto (esterco de bovino, vermicomposto) e a ausência de fertilizantes minerais, foram essenciais para uma menor absorção de nitratos pelas plantas. Por outro lado, no método hidropónico, foram

usados fertilizantes azotados, originando uma maior acumulação de nitratos nas plantas (Miyazawa et al., 2001).

A forma de armazenamento, após colheita dos alimentos, influencia os níveis de nitratos existentes. Quando os vegetais são armazenados crus, à temperatura ambiente, ocorre a diminuição dos teores de nitratos, e o aumento nos teores de nitritos contidos em tecidos de vegetais frescos, o que se salientou quando o seu armazenamento foi realizado em lugares com temperaturas mais elevadas. Chung mostrou que em vegetais armazenado a 5°C, durante 7 dias, os níveis de nitratos se mantêm intatos, no repolho chinês, nos espinafres, e nos nitritos, as concentrações mantêm-se baixas durante todo o armazenamento (possivelmente devido à inibição da enzima nitrato reductase) (Chung et al., 2004; EFSA, 2008). Um armazenamento sob condições de congelação inibe a enzima que transforma o nitrato em nitrito, fazendo com que não ocorra acumulação e transformação durante este período, não ocorrendo qualquer tipo de alterações nos alimentos analisados (espinafre, beterraba, cenoura, raiz de sala, aipo e batatas), durante 12 semanas (EFSA, 2008).

Os diversos tipos de processamento dos alimentos, como a lavagem, o descasque, o corte, o enxaguamento e até a confeção dos mesmos, podem contribuir para uma diminuição dos níveis de nitratos e nitritos existentes. Esta perda de nitratos e nitritos, 18-50% e 25-75%, respetivamente, durante o processamento preliminar à confeção, é devido grande parte à solubilidade dos nitratos em água. Já durante a confeção, a ebulição é responsável pela grande parte de redução dos níveis de nitratos (47-56%) (Schuster & Lee, 1987; Huarte-Mendicoa et al., 1997; Rytel et al., 2005; EFSA, 2008; Prasad & Chetty, 2008; Leszczynska et al., 2009; Mozolewski & Smoczynski, 2009).

2.1.6. Metabolismo de ação dos nitratos e nitritos

Compreender o metabolismo dos nitratos quando ingeridos é algo imprescindível para a compreensão das suas funções no organismo. Existem duas formas de os nitratos “entrarem” no organismo, as fontes endógenas, quando é produzido pelo próprio metabolismo, e as exógenas, que dependem de fatores externos que são intencionalmente ingeridos (figura 2.4).

Como principal fonte de exposição exógena aos nitratos, tem-se os alimentos e a água. Contudo, os produtos hortícolas prevalecem nos níveis de exposição, correspondendo a cerca de 80-94% da ingestão diária de nitratos da população, seguindo-se então a água e, assiduamente, os produtos cárneos curados (Veiga et al., 2009).

A entrada dos nitratos no organismo é complexa, contudo a absorção pelo organismo e a consequente entrada para a circulação sanguínea ocorre com grande facilidade no trato gastrointestinal, devido à sua polaridade, onde atinge o pico máximo das concentrações plasmáticas ao fim de 1h. Ocorre a absorção imediata dos nitratos por parte da região superior do trato gastrointestinal (da boca ao estômago), dos quais 25% ficam nas glândulas salivares e 65% são excretados pela urina. Os nitratos são reduzidos a nitritos, cerca de 5-10%, pela ação de bactérias anaeróbias facultativas redutoras de nitrato (saprófitas), existentes na língua, estômago e intestinos. A concentração do nitrito salivar está diretamente relacionada com a quantidade de nitratos ingeridos, e

representa cerca de 80% da exposição total (humana) aos nitritos (Lundberg et al., 2004; ASAE, 2007; Veiga et al., 2009; Govari & Pexara, 2018).

Seguindo-se para o estômago, os nitritos pré-transformados na cavidade bucal, sob as condições ácidas do estômago, reagem com as amidas e aminas (que originam compostos N-nitrosos) ou são protonados e dão origem ao ácido nitroso. Parte do nitrito gástrico também é absorvido para a circulação sanguínea, onde é oxidado pela hemoglobina, sendo convertido em nitrato, que, por sua vez, é introduzido na via enterossalivar (via contínua) (Lundberg et al., 2004; ASAE, 2007; EFSA, 2008; Veiga et al., 2009; IARC, 2018).

Em condições normais, a síntese endógena de nitrato/nitrito ocorre em diversos locais do corpo, fígado, cérebro, vasos sanguíneos e locais de inflamação, iniciando-se na via L-arginina-NO síntese, onde ocorre a conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina e, por consequente, ocorre formação de óxido nítrico (NO), por ação da enzima óxido nítrico síntase (NOS). Durante um estado de enfermidade sistemático, os leucócitos produzem grandes quantidades de óxido nítrico que em contato com a hemoglobina oxidada, originam, a metahemoglobina e o aumento considerável na concentração de nitrato no plasma. A presença de grandes quantidades de nitrato nos organismo é potencialmente perigoso devido à sua facilidade em se converter em nitritos, endogenamente, podendo posteriormente reagir com aminas/amidas e formar compostos N-nitrosos potencialmente cancerígenos (Lundberg et al., 2004; ASAE, 2007; EFSA, 2008; Veiga et al., 2009; IARC, 2018).

Existe uma forma de inibir as reações de nitrosação no estômago, através da presença de antioxidantes (Veiga et al., 2009). O ácido ascórbico, é um antioxidante, que está presente na composição de muitos vegetais, de modo que, em maior parte das vezes, quando se consome nitritos/nitratos também se consome ácido ascórbico, prevenindo assim a formação de compostos N-nitrosos (ASAE, 2007).

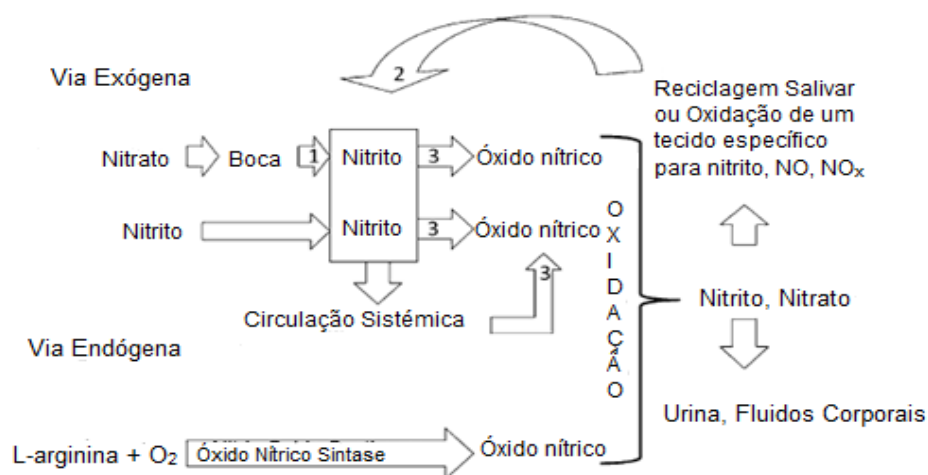


Figura 2.4- Mecanismos de transformação e transporte dos nitratos endógenos e exógenos dentro do corpo humano (Hord et al. 2009).

2.1.6. Efeitos na saúde

Embora o nitrato não seja tóxico, quando ingerido, sofre ação microbiana pela saliva, sendo reduzido a nitrito. Os nitritos, tem responsabilidade por uma parte do aumento do risco de cancro do estômago, sendo agravado pelo consumo de elevados níveis de sal, presentes nas principais fontes de nitrito (carnes processadas). Contudo, uma dieta rica em nitratos e nitritos não tem que contribuir obrigatoriamente para o cancro, se esta for associada a uma alimentação rica em antioxidantes (frutas e legumes).

Metahemoglobinémia

A população infantil, é a população mais suscetível à presença de nitrato, principalmente os latentes até aos 6 meses, podendo originar, a metahemoglobinemia infantil, doença também conhecida como “Síndrome do Bebê Azul. Surgiu nos meados do século XX, mais especificamente, em 1945, quando ocorreu a primeira ligação entre os casos de metemoglobinemia infantil e os alimentos que eram cultivados com auxílio de águas dos poços locais. Inicialmente pensou-se que a causa seria os elevados níveis de nitratos encontrados nestas águas, contudo, mais tarde verificou-se que a principal razão era a presença de certas bactérias existentes nestas águas que reduzem os nitratos em nitritos através de enzimas, muitas das vezes provenientes de excrementos de humanos ou de animais. Quando ocorreu a substituição da água dos poços pela água da torneira, verificou-se a ausência de metahemoglobinémia. Um dos grandes problemas na prevenção desta ocorrência, provém de a água não sofrer qualquer tipo de alteração nas suas características organoléticas, sendo muito difícil detetar a sua contaminação (Powlson et al., 2008; McKnight et al., 2009; Veiga et al., 2009).

A metemoglobinemia (MetHba) é causada pelo aumento da concentração da metahemoglobina no sangue, esta alteração pode ocorrer devido a uma alteração congénita ou até mesmo devido a consequências causadas pela exposição a certos agentes químicos. Origina-se muitas das vezes um quadro clínico diversificado, o que poderá prejudicar a sua deteção e muitas vezes impossibilitar o seu tratamento, chegando mesmo nos piores casos a provocar cianose, fraqueza, hipoxia, depressão do sistema nervoso central, podendo mesmo causar a morte por asfixia (Monteiro, 2014).

Quando a percentagem de metahemoglobina é superior a 1,5, aparece cianose, ou seja, diminuição de oxigénio disponível (Nascimento et al., 2008; McKnight et al., 2009) · No organismo de um bebé o que se sucede é que o ião Fe^{2+} (estado ferroso) da oxiemoglobina (formado a partir da combinação do oxigénio com a hemoglobina (Hb), nos pulmões) sofre uma oxidação, por parte do óxido nítrico, nos intestinos, havendo assim a formação do ião Fe^{3+} (estado férrico) da metahemoglobina (Powlson et al., 2008; McKnight et al., 2009). Este estado da metahemoglobina não consegue realizar o transporte de oxigénio.

A ingestão de nitratos não é tão grave como a dos nitritos, visto que, a cavidade bucal de um bebé ainda não apresenta uma grande densidade de bactérias simbióticas (até acabar o desmame), não ocorrendo redução do nitrato em nitrito. Outra grande preocupação poderia ser a presença dos nitratos/nitritos no leite materno, o que não acontece, uma vez que, as quantidades de nitratos consumidos não são concentradas no leite humano. No entanto, existe uma razão para os bebés mais

pequenos terem uma maior suscetibilidade à metahemoglobinemia, em comparação com os bebês que já deixaram amamentação. Após um bebê deixar o desmame, a acidez do estômago aumenta, originando uma maior degradação dos nitritos ingeridos, provocando uma menor absorção pelos intestinos, por outro lado, nos bebês mais pequenos, devido à baixa acidez do seu estômago, não ocorre essa degradação. No estômago dos bebês mais jovens, também existem baixas concentrações de agentes redutores, não ocorrendo a diminuição dos nitratos/nitritos ingeridos, para além de a enzima metahemoglobina reductase só começar a funcionar a 100% após o desmame (McKnight et al., 2009; Veiga et al., 2009).

Cancro

Existe uma grande preocupação sobre o nitrato, e a sua associação ao cancro gastrointestinal, a IARC (*International Agency for Research on Cancer*), identificou os nitratos e nitritos como possíveis agentes carcinogénicos, sob possíveis condições de reações endógenas. Alguns estudos foram realizados de forma a se entender se os nitratos estão diretamente relacionados ao aparecimento do cancro, ou não, apresentados na figura 2.5 (McKnight et al., 2009; Veiga et al., 2009).

Estudos que sugerem o papel dos nitrato na causa do cancro gastrointestinal		Estudos que demonstram evidências contra o papel dos nitratos na causa do cancro gastrointestinal	
País	Referência	País	Referência
Reino Unido	Hill <i>et al.</i> (1973)	EUA	Geleperin <i>et al.</i> (1976)
Colômbia	Correa <i>et al.</i> (1970)	Reino Unido	Davies (1980)
Colômbia	Cuello <i>et al.</i> (1976)	Reino Unido	Beresford (1985)
Chile	Zaldivar <i>et al.</i> (1977)	Chile	Armijo <i>et al.</i> (1981)
Hungria	Juhasz <i>et al.</i> (1980)	França	Vincent <i>et al.</i> (1983)
Itália	Amadori <i>et al.</i> (1980)	Itália	Knight <i>et al.</i> (1990)
Dinamarca	Jensen <i>et al.</i> (1982)	Espanha	Pobel <i>et al.</i> (1995)

Figura 2.5 -Tabela com estudos publicados que evidenciam sobre a favor e contra o consumo de nitratos estar relacionado com o cancro gastrointestinal (McKnight et al., 2009).

Na monografia da IARC, os estudos realizados em humanos, não apresentam conexão entre a ingestão de nitratos e o cancro do estômago e/ou do esófago, ocorrendo mesmo uma conexão inversa, em alguns dos casos, o que poderá estar atribuída aos nutrientes provenientes do consumo elevado de produtos hortícolas. Resumindo, não houve nenhum estudo que permitiu associar a ingestão de compostos azotados ao desenvolvimento de tumores (cerebrais, trato urinário e colo-retal) (IARC, 2010).

Embora não existam evidências, de que o cancro e o consumo de nitratos estão associados, as investigações irão continuar.

2.1.7. Relação entre o Risco/Benefício

Os regulamentos são baseados em princípios que demonstram os efeitos prejudiciais aquando o nitrato presente na dieta (Katan, 2009). No entanto, pesquisas recentes mostraram potenciais ações benéficas, por parte do nitrito, na defesa do hospedeiro através de atividade microbiana, por parte do óxido nítrico, na função de papéis importantes fisiológicos, como na vasorregulação. Embora a maior percentagem de ingestão de nitratos seja através no consumo de vegetais, os seus efeitos benéficos para a saúde são sobrevalorizados (Santamaria, 2006; EFSA, 2008).

Através da comparação dos riscos e dos benefícios da exposição aos nitratos, não houve um risco apreciável que se sobrepujasse aos benefícios reconhecidos do consumo de hortícolas. Existem certas circunstâncias ocasionais e condições de produção locais desfavoráveis para os vegetais. Contudo, não existe nenhuma análise quantitativa de risco-benefício a nível europeu/internacional de forma a se obter dados concretos do consumo de nitratos (EFSA, 2008).

2.2. Legislação

Um das principais preocupações a nível Nacional e Europeu é a poluição da água, principalmente da que tem origem em zonas com atividade agrícola. No Decreto-Lei nº235/97 de 3 de Setembro: “Pretende-se com este diploma não só fazer a transposição para o direito interno das disposições contidas na Diretiva nº 91/676/CEE, do Conselho, de 12 de Dezembro de 1991, relativa à proteção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola, mas também clarificar atribuições e responsabilidades das várias entidades com intervenção neste domínio.”(Ministério do Ambiente, 1997). Contudo, houve uma nova alteração pelo Decreto-Lei 68/99, de 11 de Março, alterando os artigos 4º, 5º e 7º e os seus anexos I e V (Ministério do Ambiente, 1999). Em 2017, “Considerando que decorridos 20 anos sobre a publicação do primeiro Código de Boas Práticas Agrícolas em 1997, urge proceder à sua revisão, concretizada pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P., com a coordenação conjunta deste Instituto com a Direção -Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, ouvida a Agência Portuguesa do Ambiente, I. P., os competentes serviços do Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural e as organizações do setor agrícola.” “Os Secretários de Estado do Ambiente e das Florestas e do Desenvolvimento Rural, aprovam o Código de Boas Práticas Agrícolas, em anexo ao presente despacho e que dele faz parte integrante” (Gabinetes dos Secretários de Estado do Ambiente e das Florestas e do Desenvolvimento Rural, 2018).

Em 1961, ocorreu a primeira avaliação internacional respetivamente aos riscos de ingestão de nitrato e nitrito através dos alimentos, pelo Comité Conjuntos de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação) /OMS (JECFA). Em 1990, o Comité Científico da Alimentação Humana estabeleceu uma DDA de 0-3,7 mg/kg de peso corporal para o consumo de nitrato, e em 1995 estabeleceu uma DDA de 0-0,06 mg/kg de peso corporal para o nitrito, após o estudo dos seus efeitos toxicológicos (Larsoon et al., 2011; EFSA, 2017). O mesmo Comité, realizou a sua retificação mais recente em 2002, em que a DDA de nitratos continuou igual, mas a de nitritos alterou o seu valor para 0,07 mg/kg de peso corporal (European Commission, 1995; EFSA, 2008). Nos alimentos, a concentração máxima permitida de nitratos, varia entre 200-7000 mg/kg consoante o alimento, e na água potável, é de 50 mg/L e 0,5 mg/L, de nitratos e nitritos, respetivamente (Comissão Europeia, 2006; União Europeia, 2011; Ministério do Ambiente, 2017).

O Regulamento (CEE) nº1881/2006 da Comissão, de 19 de dezembro fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, estabelece os teores máximos para os nitratos presentes em determinados géneros alimentícios. Em 2011, a Comissão Europeia, através do regulamento 1258/2011, alterou níveis máximos de nitratos em alguns produtos hortícolas, mais especificamente, nos espinafres frescos e na alface e adicionou limites para novos produtos, ainda não mencionados no anterior regulamento. Os teores máximos de nitratos são fixados conforme as condições de cultivo e a sazonalidade (Comissão Europeia, 2006; União Europeia, 2011):

- Os espinafres frescos (*Spinacia oleracea*), apresentam um limite máximo de nitratos de 3500 mg/kg, independentemente das condições de cultivo.

- A alface fresca (*Lactuca sativa L.*), apresentam um limite máximo de nitratos quando cultivada em estufas, de 5000 mg/kg e 4000 mg/kg, entre 1/10-31/03 e 1/04-30/09, respetivamente, e quando cultivada em campos, de 4000 mg/kg e 3000 mg/kg, entre 1/10-31/03 e 1/04-30/09, respetivamente.
- A alface tipo "iceberg", apresenta um limite máximo de nitratos superior quando cultivada em estufas, 2500 mg/kg, em comparação com o limite máximo quando cultivada nos campos, 2000 mg/kg.
- A rúcula (*Eruca sativa*), apresenta um limite máximo de nitratos, maior, quando colhida no período entre 1/10 e 31/03 (7000 mg/kg), em relação ao limite máximo de nitratos da que é recolhida no período entre 1/04 e 30/09 (6000 mg/kg).
- Os espinafres congelados/ultracongelados/conservados (2000 mg/kg) e os alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens (200 mg/kg), apresentam um limite máximo de nitratos constante em qualquer altura do ano independentemente das condições de cultivo ou produção.

2.3 Estudos da Dieta Total (TDS)

Desde a década de 60 que são realizados Estudos da Dieta Total, na Holanda e no Reino Unido, mais especificamente. Desde essa altura, os estudos têm vindo sempre a melhorar. Os princípios essenciais de um estudo de TDS é representar toda a dieta alimentar, agrupar os alimentos e analisar os alimentos da forma como são consumidos pela população alvo do estudo (EFSA et al., 2011).

A OMS, agência líder das Nações Unidas para a saúde, apoia o Estudo da Dieta Total, como um dos meios mais eficientes de garantir que as pessoas não sejam expostas a níveis perigosos de produtos químicos e tóxicos através dos alimentos. De acordo com a FAO "A Organização deve colecionar, analisar, interpretar e disseminar informações relacionadas à nutrição, alimentação e agricultura" (EFSA et al., 2011).

O projeto do Total Diet Study Exposure, é uma ferramenta utilizada para avaliar a exposição da população a substâncias químicas, benéficas e prejudiciais através da alimentação, analisando os alimentos tal e qual como consumidos pela população. Este estudo teve como principais objetivos, estimar a ingestão de contaminantes ingeridos, aumentar o número de estudos TDS pela Europa e desenvolver uma base de dados de TDS europeia, de forma a fazer uma gestão de risco. Este estudo é visto como uma mais valia para a Saúde Pública, porque facilita a avaliação de risco (RA) e a monitorização (HM) (Volatier, 2016).

2.3.1. FoodEx2

O FoodEx2 (*Food Classification and Description System*) é um sistema de classificação e descrição dos alimentos, um sistema padronizado, desenvolvido pela EFSA (*European Food Safety Authority*). Este sistema foi uma "evolução" da primeira versão do sistema de classificação e descrição de alimentos para avaliação da exposição, implementado pelo mesmo. Este sistema, consiste na agregação de um grande número de alimentos individuais em grupos e categorias de alimentos mais abrangentes. A EFSA, estabeleceu uma colaboração com diversas instituições, para o uso da FoodEx2, entre elas, a FAO (Anexo I).

2.4. Metodologia Analítica

2.4.1. Fundamentos de HPLC

Desde o início do século XX que surgiram grandes desenvolvimentos na cromatografia líquida, gerando colunas mais eficientes devido ao seu aprimoramento na fase estacionária com a diminuição do tamanho das partículas. Todavia, a diminuição das partículas originou o aumento da resistência à passagem da fase móvel, sendo imprescindível o acesso a uma pressurização do sistema através de bombas de alta pressão. Surgindo assim, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ou *High-Performance Liquid Chromatography*, mais conhecida como HPLC. Esta metodologia consiste numa técnica de identificação e quantificação dos constituintes presentes em qualquer tipo de amostra (fármacos, alimentos, cosméticos, entre outros) (Claessens & Straten, 2004). De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), a cromatografia é um método físico de separação na qual os componentes são separados e distribuídos em duas fases distintas, uma das quais é a fase estacionária, e a outra é a fase móvel (Nollet, 2000).

O HPLC é uma das técnicas mais segura, rápida, fiável e versátil para o controlo de qualidade, sendo também uma das mais poderosas técnicas de separação, conseguindo-se desta forma uma rápida separação de misturas intrínsecas de um ingrediente com alta precisão e especificidade (Nollet, 2000; Malviya et al., 2010). O comportamento da retenção e a resolução da coluna depende das características da coluna, como é o caso da porosidade, comprimento da coluna, das características da eluição (a fase móvel, o pH, o modificador orgânico) (Nollet, 2000) e a percentagem de carga de carbono.

2.4.2. Equipamento do HPLC

O equipamento utilizado para a análise das amostras, é constituído por diversos componentes, como é o caso, da bomba de alta pressão, do injetor, de uma coluna cromatográfica, da fase móvel e da fase estacionária, do detetor UV, de um sistema de recolha de dados e ainda de um depósito para onde são enviados os resíduos (figura 2.6).

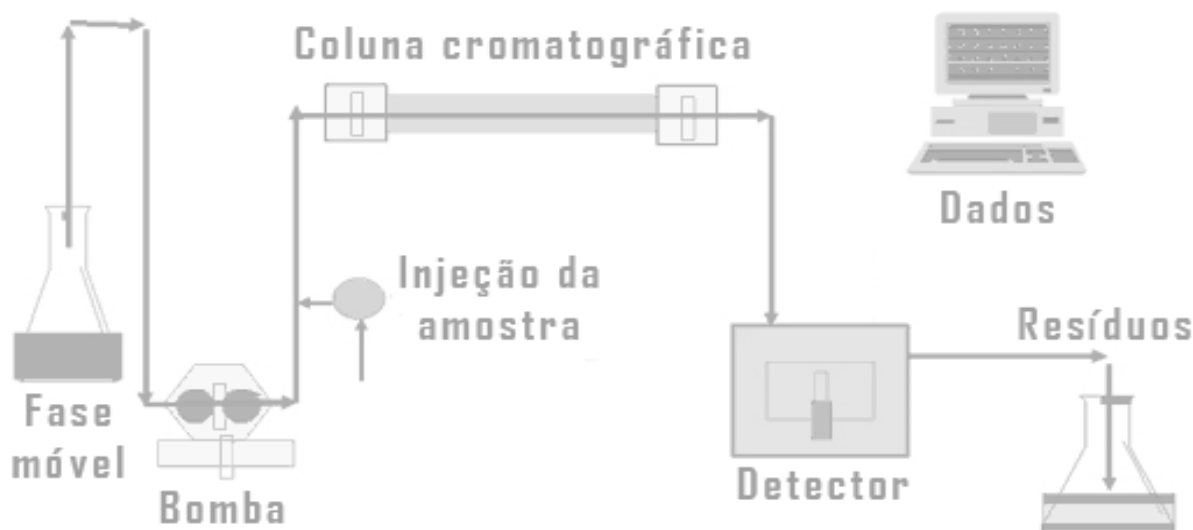


Figura 2.6- Esquema das componentes do sistema de HPLC

Retirado de: <http://graduandosfarmacia.blogspot.com/2014/03/cromatografia-liquida-de-alta.html>.

Aquando do início da análise das amostras, é necessário haver uma regulação exata das temperaturas, tanto das amostras, como da coluna, e ainda uma estabilização do detetor.

O sistema de bombagem garante a criação de um fluxo (ml/min) com um caudal controlado de fase móvel conduzindo-a à coluna, a uma pressão elevada (Nollet, 2000; Silva, 2014).

O sistema de injeção, injeta uma porção exata da amostra, com auxílio de uma seringa de injeção automática, na fase móvel (Nollet, 2000; Silva, 2014).

A deteção dos componentes separados, é realizada com o auxílio de um detetor, sendo os detetores UV/Vis e de fluorescência os mais usados. Através de uma monitorização consecutiva do efluente que é eluído da coluna cromatográfica, passando por um detetor, que possui a sensibilidade para replicar as alterações de concentração detetadas no(s) analito(s) de interesse (Nollet, 2000).

O sinal emitido pelo detetor é enviado para o aparelho de recolha de dados, como por exemplo o programa no computador. Os softwares utilizados no processamento e tratamento de dados, durante a análise, têm a função de fornecerem os cromatogramas de cada amostra. Cada analito é representado por um tempo de retenção diferente, e cada área do pico representa a quantidade de analito. Aquando a análise dos dados é possível a sua manipulação, de forma a obter o melhor pico cromatográfico com a finalidade de obter um resultado mais real (Nollet, 2000; The International Pharmacopoeia, 2017; The Linde Group, 2019).

Um das questões mais importantes para o desenvolvimento do método analítico consiste na seleção do tipo de coluna para a separação. É esta escolha que vai determinar a seletividade e eficiência da separação do analito, e, por conseguinte, a qualidade de resolução dos cromatogramas (Nollet, 2000).

2.4.3. Diferentes métodos de separação

HPLC é uma técnica que apresenta diferentes formas de separação, baseados em mecanismos de partição (NP-HPLC e RP-HPLC), mais especificamente, na polaridade dos analitos, e consequentemente da sua afinidade para com a fase móvel e estacionária (Skoog et al., 2007).

2.4.3.1. Cromatografia de fase normal (NP-HPLC)

Este método de separação é baseado na polaridade. A fase estacionária neste processo é polar e a fase móvel apolar, desta forma, o analito polar interage, ficando retido pela fase estacionária. Assim sendo, os analitos com menor polaridade são os primeiros a serem eluídos da coluna, apresentado assim o analito mais polar, o que se pretende analisar, com um maior tempo de retenção na coluna (Nollet, 2000; Malviya et al., 2010; Silva, 2014).

2.4.3.2. Cromatografia de fase inversa (RP-HPLC)

Neste tipo de cromatografia como o nome indica, consiste na fase inversa da NP-HPLC, ou seja, neste tipo de cromatografia a fase estacionária (hidrofóbica) que está ligada à sílica, é apolar e a fase móvel (hidrofílica) é polar. Neste caso, quanto maior a polaridade menor o tempo de retenção, sendo desta forma eluídos da coluna em primeiro lugar, uma vez que apresentam uma maior afinidade com a fase móvel (Ball, 1988; Skoog et al., 2007; Malviya et al., 2010; Silva, 2014).

2.4.3.3. Alternativa ao HPLC

Existem outras técnicas de separação de compostos, alternativas ao HPLC, tais como: Cromatografia Gasosa (CG), que só pode ser usada em amostras voláteis a uma temperatura inferior a 300°C, sendo considerada uma técnica mais eficiente do que o HPLC, uma vez que, as separações são efetuadas de forma mais rápida e eficiente; e a Cromatografia em Camada-Fina (CCF), sendo um método menos eficiente, por outro lado, analisa uma maior quantidade de compostos numa só análise, contudo, essa análise em termos de quantificação de analito(s) é menos precisa do que uma análise realizada por HPLC (Snyder & Dolan, 1979).

Para a deteção de Nitratos e Nitritos são utilizadas outras técnicas além do HPLC, como é o caso da espectrofotometria, potenciometria, polarografia e eletroforese capilar (Bahadoran et al., 2016).

2.4.4. Validação do Método

Para o método ser aceite, é sempre obrigatório se proceder à sua validação. O grande objetivo da validação de um método não é apenas obter estimativas de exatidão e precisão, mas também, a avaliação dos riscos apresentados pela incerteza da medição referentes ao resultado (RELACRE, 2000). A ISO (*International Organization for Standardization*) 5725, define exatidão como a uniformidade entre a média aritmética de um elevado número de resultados de ensaio e o valor de referência estimado, e a precisão é referida de acordo com a proximidade entre os resultados obtidos (ISO, 1994).

A validação do método, é usada para garantir que o método é aplicado da melhor forma possível, oferecendo a garantia de qualidade. Esta validação consiste num processo continuado, podendo haver a necessidade de ser revalidada caso hajam modificações nas características do método já normalizado e validado, durante o procedimento (Thompson et al., 2002; Martins, 2016). Assim, existe a garantia que em ensaios futuros os resultados serão muito próximos ao valor verdadeiro do teor do analito em estudo. Para comprovar a validação do método é necessário garantir a análise de alguns critérios (González & Herrador, 2007).

2.4.4.1. Especificidade e Seletividade

A seletividade consiste na capacidade de identificar, reconhecer e quantificar com precisão o analito em estudo numa determinada matriz, sem a intervenção dos restantes constituintes (possíveis impurezas, compostos com propriedades idênticas às do analito em estudo) (RELACRE, 2000). As amostras são analisadas em duplicado e conforme as condições de repetibilidade. Por outro lado, a especificidade consiste na ausência absoluta de qualquer tipo de interferente na amostra, a qual permite distinguir o analito em estudo das outras substâncias, sem que hajam hesitações de que a grandeza observada é apenas do analito. Assim sendo, especificidade = 100% de seletividade (González & Herrador, 2007).

Um método analítico pode ser considerado aplicável (específico e seletivo) quando na prática, e após a execução dos testes de recuperação, se verificar uma percentagem da taxa de recuperação próxima de 100%. A seletividade pode ser avaliada de diversas formas, nomeadamente, pela comparação de uma matriz isenta em comparação com uma matriz incluindo o analito (Green, 1995; ICH, 1995; González & Herrador, 2007).

2.4.4.2. Gama de trabalho

A gama de trabalho é o intervalo de pontos correspondentes à curva de calibração. Para a realização da curva de calibração, deve-se ter em conta que é necessário a realização de, no mínimo, 5 padrões de calibração, não contando com o zero da curva, de forma a não se associarem erros aleatórios. As soluções padrão devem ser equitativamente espaçadas na faixa de concentrações de conveniência e devem ser realizadas em duplicado ou em triplicado.

Este estudo deve ser efetuado durante a fase de aprovação/implementação do método e sempre que se prove a sua necessidade. Contudo, se basear o método numa gama de trabalho já implementada em referências bibliográficas autenticadas, torna dispensável a sua análise. Pela norma

ISO 8466-1, são recomendadas 10 réplicas, correspondentes aos pontos extremos da gama de concentração. De modo a averiguar a viabilidade da gama de trabalho, é realizado um teste de homogeneidade de variâncias que consiste na determinação das variâncias dos padrões das soluções de concentração inferior e superior, ou seja, o primeiro e o último da reta de calibração, S^2_1 e S^2_{10} , através da equação 5.

$$S^2_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (\text{equação 5})$$

Onde, **i** corresponde ao número do padrão (1 a 10) e **j** ao número de repetições efetuadas em cada padrão. Após a revelação sobre existirem, ou não, diferenças significativas entre as variâncias, segue-se para o cálculo do valor teste PG, através das equações 6 e 7.

$$PG = \frac{S^2_{10}}{S^2_1}, \text{ quando } S^2_{10} > S^2_1 \quad (\text{equação 6})$$

$$PG = \frac{S^2_1}{S^2_{10}}, \text{ quando } S^2_1 > S^2_{10} \quad (\text{equação 7})$$

Os valores obtidos nas equações anteriores são comparados com os valores tabelados de Fisher, aquando em conformidade para n-1 graus de liberdade, de forma a se determinar se as diferenças de variâncias são significativas ou não. Caso, PG seja superior aos valores tabelados de Fisher, então, as diferenças de variâncias são significativas, por outro lado, se os valores tabelados de Fisher forem superiores ou iguais ao valor de PG, então, tem-se que não existem diferenças significativas entre as variâncias. Portanto, não havendo diferenças significativas entre as variâncias dos padrões, sabe-se que os valores da gama de trabalho estão bem ajustados (ISO, 1990; RELACRE, 2000).

2.4.4.3. Linearidade

Quando o sinal produzido é diretamente proporcional à concentração do analito, dentro da gama de trabalho, diz-se apresentar linearidade. Esta linearidade é padronizada e expressa matematicamente de forma a ser mais acessível determinar a concentração do analito na amostra real, através da equação 8.

$$Y = mx + b \quad (\text{equação 8})$$

onde, **y** corresponde ao sinal detetado (absorbância, área do pico, altura do pico), **x** à concentração do analito, **m** o declive da reta e **b** a interseção com o eixo, quando $x=0$. Em métodos como este em que a base é a curva de calibração, tem-se a necessidade de testar a linearidade através de modelos estatísticos como é descrito na norma ISO 8466-1. Podendo-se utilizar o teste de Mendel

e Fisher. Pelo teste de Mendel, determina-se os desvios padrão residuais, o linear e o não-linear, $S^2_{y/x}$ e S^2_{y2} , com auxílio da equação 9 e 10.

$$S^2_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}{N-2}} \quad (\text{equação 9})$$

$$S^2_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_2)^2}{N-3}} \quad (\text{equação 10})$$

Sendo a diferença entre as duas variâncias, DS^2 , determinada pela equação 11.

$$DS^2 = (N-2) \cdot S^2_{y/x} - (N-3) \cdot S^2_{y2} \quad (\text{equação 11})$$

onde, **N** corresponde ao nº de padrões de calibração existentes no método. Calculando-se de seguida, o valor teste, PG, pela equação 12.

$$PG = \frac{DS^2}{S^2_{y2}} \quad (\text{equação 12})$$

O valor de PG obtido é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, onde se conclui que se o valor de PG for igual ou inferior ao valor tabelado, tem-se que a função de calibração é linear, pelo contrário, se o valor de PG for superior ao valor tabelado, tem-se que a função de calibração é não linear. Porém, com o método dos mínimos quadrados, obtém-se o melhor acerto dos pontos conseguidos.

Quando se utiliza um determinado método analítico há que se avaliar sempre a linearidade da sua curva de calibração, através da sua análise gráfica simultaneamente à do coeficiente de correlação. O coeficiente de correlação pode variar entre -1 e 1, quanto mais próximo de -1 ou 1, maior é a associação entre as variáveis, contrariamente, quanto mais próximo for de 0, menor é a associação (RELACRE, 2000; Thompson et al., 2002).

2.4.4.4. Sensibilidade

A sensibilidade corresponde à alteração do resultado em função da quantidade obtida de analito, ou seja, é elucidada como o menor acréscimo da quantidade de analito fundamental de forma a provocar uma variação do sinal. Este parâmetro refere-se também ao declive da equação da reta deduzida (equação 8). Porém, se a curva de calibração validar a linearidade, tem-se que a sensibilidade será sempre constante, sendo igual ao declive dessa mesma reta (equação 13).

$$S = \frac{\Delta S}{\Delta C} \quad (\text{equação 13})$$

Onde, ΔC corresponde à variação da concentração e ΔS à variação do sinal obtido. Todavia, a compreensão desta propriedade provoca muito interesse, devido, à sua relatividade aquando se quer apurar a evolução deste parâmetro ao longo do tempo, quando se compara em diferentes analitos e quando se compara entre diferentes métodos analíticos, lineares, para um mesmo analito.

Contudo, a capacidade da sensibilidade está associada à capacidade de resposta do analito que por sua vez não se deve deixar confundir com o limite de deteção, este que se apresenta como a menor concentração de analito detetada (RELACRE, 2000; Thompson et al., 2002).

2.4.4.5. Limites Analíticos (LOQ e LOD)

Os limites analíticos demonstram o desempenho do método de análise, são eles limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ):

Limite de Deteção

Consiste na menor concentração de analito detetável, através de um procedimento analítico concebível, em que a quantidade de analito não tem que ser necessariamente quantificável para ser válida (RELACRE, 2000; Thompson et al., 2002; Silva, 2014).

O limite de deteção pode ser calculado/detetado de três formas diferentes. Primeira é através do método visual, em que se adiciona uma quantidade conhecida do analito de interesse, que por sua vez, se consegue distinguir entre o ruído e o sinal analítico da menor concentração detetável. Segunda é através do método da relação sinal-ruído, que pode ser utilizado apenas quando existe ruído na linha de base do cromatogramas. Este método é calculado pela comparação dos sinais provenientes da amostra com baixa concentração (conhecida) de analito e de um branco. A relação sinal/ruído normalmente aceite é de 2:1 e 3:1 (RELACRE, 2000; Thompson et al., 2002; Silva, 2014). Terceira é através do método analítico, a partir da equação 14.

$$LOD = 3,3 \times \frac{S_{y/x}}{b} \quad (\text{equação 14})$$

Onde, $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração e o b é o declive da mesma (RELACRE, 2000).

Limite de Quantificação

Por outro lado, o limite de quantificação consiste na menor concentração de analito que pode ser quantificável de forma válida por um método analítico de confiança mais especificamente com precisão e exatidão (Mocak et al., 1997). No entanto, quanto menor for o valor de LOQ, menor é a precisão, assim sendo, se for necessário uma grande precisão na avaliação do LOQ tem que se aumentar o valor

da sua concentração. Na prática, corresponde por vezes ao padrão de calibração de concentração mais baixa.

Em relação à forma como pode ser determinado, adequam-se os mesmos critérios do que no LOD, ou seja, pode ser determinado pelo método sinal/ruído, em que neste caso a relação aceite é de 10:1, e pelo método analítico pela equação 15.

$$LOQ = 10 \times \frac{S_{y/x}}{b} \quad (\text{equação 15})$$

Onde, $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração e o b é o declive da mesma (RELACRE, 2000).

2.4.4.6. Precisão

A precisão é um parâmetro analítico, utilizado para avaliar a concordância entre os resultados dos ensaios realizados. A repetibilidade, reprodutibilidade e a precisão intermédia são definições distintas usadas para avaliar a dispersão dos resultados. A precisão intermédia, pode ser estimada através da avaliação do desvio padrão absoluto (S), pelo intervalo de confiança da média ou através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também denominado de coeficiente de variação (CV), sendo determinado pela equação 16.

$$CV(\%) = \frac{S}{x} \times 100 \quad (\text{equação 16})$$

Onde, x corresponde à média aritmética de um pequeno número de medições. A análise final deste critério de avaliação, com objetivo de obtenção do parâmetro qualidade, é realizada tendo em conta todos os possíveis erros aleatórios. A complexidade da amostra faz o RSD variar, caso seja uma amostra em quantidades macro, requer um RSD de 1-2%, se for um método de análise de impurezas, o RSD varia até 20% (RELACRE, 2000; Ribani et al., 2004).

2.4.4.7. Repetibilidade

Consiste na capacidade de precisão de um método de ensaio, com medições sucessivas, realizadas sob as seguintes condições: num curto período de tempo; sempre com o mesmo procedimento e equipamento; sempre com o mesmo analista; sempre no mesmo local (laboratório) (RELACRE, 2000).

Quando os ensaios são realizados sempre no mesmo local, sugere-se a realização de cerca de 10 medições na mesma amostra/padrão. Se os resultados fundamentarem esta repetibilidade de medições, segue-se então para a realização do mesmo procedimento, mas para enumeres amostras com diferentes concentrações, de forma abranger toda a gama de trabalho. Por outro lado, quando os ensaios realizados em locais diferentes, a realização das medições poderá ser inferior, sendo no mínimo necessário efetuar 2 repetições por amostra (RELACRE, 2000; Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial, 2007).

O desvio padrão relativo da repetibilidade (RSD_r) também denominado de coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) é expresso em %, dado pela equação 17.

$$CV_r(\%) = \frac{S_{ri}}{x} \times 100 \quad (\text{equação 17})$$

Onde, x corresponde à média aritmética de um pequeno número de medições, e S_{ri} ao desvio padrão da repetibilidade associado aos resultados.

2.4.4.8. Reprodutibilidade

Ao contrário do que se está à espera na repetibilidade, a reprodutibilidade, consiste na capacidade de precisão de um método de ensaio, numa mesma amostra, realizado sob condições variadas: em épocas diferentes; diferentes equipamentos; diferentes laboratórios, e com diferentes analistas. Esta precisão é denominada de precisão intermediária.

Este parâmetro não é utilizado para a validação de um método realizado por um único laboratório, mas é valorizado quando um laboratório necessita de verificações de cumprimento dos seus métodos por comparação de dados validados por outro(s) laboratório(s) (RELACRE, 2000; Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial, 2007).

2.4.4.9. Precisão intermédia

Também denominada de reprodutibilidade interna, consiste na variabilidade de resultados que representa melhor um laboratório, sendo a mais recomendável de utilizar (RELACRE, 2000; Ribani et al., 2004; Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial, 2007).

A precisão intermédia, é expressa em termos do coeficiente de variação de reprodutibilidade (CV_R), sendo descrita pela equação 18.

$$CV_R(\%) = \frac{S_{ri}}{x} \times 100 \quad (\text{equação 18})$$

Onde, x corresponde à média aritmética de um pequeno número de medições, e S_{ri} ao desvio padrão da repetibilidade associado aos resultados.

2.4.4.10. Recuperação

A recuperação do analito, é determinada pela análise de amostras em que se adiciona quantidades conhecidas de soluções padrão do mesmo. O analito pode se apresentar com pelo menos três concentrações diferentes, nas amostras, aproximadas ao limite de deteção, à concentração máxima permitida e à média do limite de uso do método. No entanto este parâmetro, tal como todos os outros, apresenta limitações. Como o analito é adicionado numa forma diferentes, neste caso, numa

forma em que é facilmente detetável, muitas das vezes os resultados obtidos são sobrevalorizados, o que na realidade não se verifica. Sendo a recuperação do analito calculada pela equação 19.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (\text{equação 19})$$

Onde, C_1 corresponde à concentração da amostra com adição de padrão; C_2 corresponde à concentração da amostra sem adição de padrão; C_3 corresponde à concentração adicionada de padrão (Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial, 2007).

2.4.4.11. Exatidão

Constitui a coerência entre o valor de referência e o valor obtido pelo respetivo método. A exatidão, aquando utilizada numa série de resultados, envolve a união de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. Dos critérios recomendados aquando a validação de um método é a utilização de Materiais de Referência Certificados e de ensaios interlaboratoriais, ambos contribuem para o Controlo de Qualidade laboratorial.

Os Materiais de Referência, possuem uma grandeza e uma incerteza associada, para cada parâmetro, o que conseqüentemente faz com que a sua aquisição tenha de ser realizada por um fornecedor credível, como é o caso do IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*) antiga BCR (*Bureau Communautaire de Références*), do NIST (*National Institute of Standards and Technology*). São usados para avaliar o desempenho do laboratório

Os ensaios interlaboratoriais, dividem-se conforme o seu objetivo, os de aptidão, para todos os laboratórios participantes e que são alvos de uma avaliação que vai determinar o desempenho das suas condições para a sua acreditação, e os de normalização, cujo objetivo é focar-se no estudo dos parâmetros de um método específico de análise. Os resultados alcançados, pelo laboratório, deve ser alvo de uma análise pormenorizada, sendo necessário a validação por parte de laboratórios certificados, como o caso do FAPAS (*Food Analysis Performance Assessment Scheme*).

O Factor de desempenho Z (“Z-score”), é um dos métodos analíticos para determinar a exatidão de ambos os critérios referidos anteriormente. Os resultados obtidos pelo MRC e pelos ensaios interlaboratoriais devem ser sempre comparados com os resultados provenientes das entidades certificadas. Caso os valores obtidos não se encontrem dentro da gama da incerteza é necessário recorrer à determinação das causas e tentar bani-las, ou então aceitá-las, esta decisão depende diretamente do rigor do método usado pelo laboratório em questão. O Z-score é calculado pela equação 20.

$$Z - \text{score} = \frac{x_{lab} - \bar{x}_v}{s} \quad (\text{equação 20})$$

Onde, X_{lab} é o valor obtido pelo laboratório, X_v valor certificado do MRC e S o desvio (incerteza ou desvio padrão do MRC). Se Z-score ≤ 2 , o resultado é satisfatório, se variar entre $2 < Z\text{-score} \leq 3$, é questionável, e se for $Z\text{-score} \geq 3$, é incorreto (RELACRE, 2000).

2.4.4.12. Incerteza

De acordo com o Guia ISO/IEC 99:2008, a incerteza é: “parâmetro não-negativo que caracteriza a dispersão dos valores da grandeza que são atribuídos à mensuranda a partir das informações usadas” (Guia ISO/IEC, 2008).

As abordagens para a quantificação da incerteza da medição, são: abordagem “*bottom-up*”, abordagem baseada no conhecimento interlaboratorial e abordagem baseada em dados controlo interno da qualidade (RELACRE, 2018).

Este critério de avaliação define a credibilidade de um método analítico, e dos respetivos objetivos. Habitualmente, a incerteza de um método analítico é sinónimo de validação da medição, sendo que esta é definida com base na norma ISO 11352:2012, na qual se especifica um conjunto de procedimentos que autoriza aos laboratórios, estimar a incerteza dos seus resultados, de forma a que aborde os dados de validação e controlo de qualidade do método analítico. No entanto, a incerteza, por parte da comunidade analítica, levanta imensos desentendimentos, por ter incalculáveis formas de se determinar, ainda assim, é dos critérios que oferece maior confiança nos seus resultados (Martins, 2016). A incerteza divide-se em:

Quantificação da Incerteza associada à precisão

Este tipo de incerteza é determinado com base nas condições da precisão intermédia, de forma a considerar possíveis alterações do método, que regularmente, seriam persistentes, durante o mesmo dia de trabalho. Esta incerteza é calculada, com base na equação 21 (Silva, 2014; Martins, 2016).

$$u'_{\text{precisão}} = \frac{S_{\text{precisão}}}{\bar{y}} \quad (\text{equação 21})$$

Onde, $S_{\text{precisão}}$, corresponde ao desvio da precisão intermédia e, \bar{y} , à média da concentração obtida.

Quantificação da Incerteza associada à exatidão

A incerteza associada à exatidão, está relacionado com o erro metódico do ensaio. Este erro pode ser avaliado com base na utilização de material de referência certificado ou análises de amostras baseadas num método de referência. A incerteza é calculada então com auxílio da equação 22 (Silva, 2014; Costa, 2015).

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{S_{obs}^2}{n \times c_{obs}^{-2}}\right) + \left(\frac{u(C_{MRC})}{C_{MRC}}\right)^2} \quad (\text{equação 22})$$

onde, S_{obs} , correspondia ao desvio padrão da série de análises do MRC, n , ao número de análises efetuadas, $u(c_{MRC})$, incerteza padrão associada ao teor certificado do MRC, e \bar{R}_m é recuperação média do método. Sendo a recuperação média do método calculada pela equação 23.

$$\bar{R}_m = \frac{c_{obs}}{c_{MRC}} \quad (\text{equação 23})$$

onde, c_{obs} , corresponde à concentração média de uma série de análises do MRC e c_{MRC} , é o valor certificado no MRC. Contudo, após se calcular as duas incertezas, da precisão e da exatidão, pode-se então determinar a incerteza combinada expandida, através da equação 24.

$$u(y) = y \times \sqrt{(u'precisão)^2 + (u(\bar{R}_m))^2} \quad (\text{equação 24})$$

Onde, y , corresponde ao factor expansão, sendo igual a 1, se o número de ensaios for inferior a 6, o igual a 2, se o número de ensaios for igual ou superior a 6.

2.4.5. Controlo de Qualidade Interno

2.4.5.1. Repetibilidade e Linearidade do Injetor

Um parâmetro importante para a validação do método é a repetibilidade do injetor, indicando o desempenho do sistema de HPLC (bombas, coluna e condições de operação). São realizadas uma quantidade suficiente de injeções, repetidas, dos pontos extremos da gama de trabalho, de forma a se determinar o coeficiente de variação da área do sinal obtido (Sargaço, 2013; Costa, 2015).

A linearidade do injetor é determinada através de uma regressão linear, que para ser aceite tem de ter um $r^2 > 0,995$. Este parâmetro é necessário para que se possa injetar volumes diferentes da mesma amostra e obter a mesma proporcionalidade de resultados.

3. Objetivos do Trabalho

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química do Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA no âmbito do projeto *TDS Exposure*.

Os principais objetivos do trabalho foram:

- Execução de algumas etapas (repetibilidade, precisão intermédia e exatidão) da validação do método de HPLC para a determinação nitratos em matrizes alimentares;
- Análise de amostras do projeto *TDS Exposure*, para determinação dos teores de nitratos e comparação com os valores máximos permitidos na legislação em vigor;
- Contributo para a avaliação da exposição da população a nitratos.

Durante a execução deste trabalho, surgiu um imprevisto que acabou por atrasar a entrega desta Dissertação. A coluna cromatográfica, danificou-se não tendo sido possível realizar mais análises, Como o sucedido não era previsível, foi necessário a aquisição de uma nova coluna, que demorou cerca de seis meses. Este acontecimento limitou muito o trabalho realizado.

4. Parte Experimental

4.1 Equipamento e material

Os equipamentos necessários durante o desenvolvimento deste trabalho foram os seguintes:

Balança analítica → *Mettler Toledo XP205* (± 0.0001)

Placa de aquecimento → *IKA Werke*

Agitador magnético → *IKA Werke*

Potenciômetro → *Metrohm 780 pH Meter*

Bomba de vácuo → *Vacuubrand*

Sistema de desgaseificação → *Branson 3510*

Banho térmico → *Trade Raypa*

Sistema de Purificação de água *Mili-Q Element* → *Merck Milipore*

Sistema de HPLC → *Waters A2695*

Detector diodo UV-vis DAD → *Waters 2996*

Coluna Cromatográfica de permuta iônica → *Thermo Hypersil Sax*

Arca de Congelação → *Miele*

Além destes aparelhos, também foram utilizados outros materiais, como é o caso dos funis de vidro e plástico, gobelés, pipetas graduadas (1,2,5,10 mL), varetas de vidro, erlenmeyers de 200 mL, espátulas, balões volumétricos certificados (5,10,100,200, 2000 mL), copos de vidro, pompete, micropipeta, viais de vidro, papel de filtro de papel *Whatman Cat No 1004-185*, filtro PET de 0,45 μm *Chromafil xtra PET-45/25*, kitasato, pinças, pipetas Pasteur, pipeta repetitiva *Brand HandyStep electronic*, papel, sacos de plástico, funil de Buchner e gancho.

4.2 Reagentes

Durante o procedimento foram usados diversos reagentes com diferentes graus de pureza. Utilizou-se também água com uma pureza de, no mínimo, grau II, conseguida através de um sistema de purificação da água, Mili-Q (Millipore).

Reagente	Grau de Pureza	Fórmula Química	Marca
Acetonitrilo	≥99,90%	CH ₃ CN	VWR
Ácido Ortofosfórico	≥84,5%	H ₃ PO ₄	Merck
Fosfato de Potássio Anidro	≥99%	KH ₂ PO ₄	Fluka
Hexacianoferrato (II) de potássio tri-hidratado	99-102%	K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O	Merck
Nitrato de Potássio	≥99,99%	KNO ₃	Merck
Nitrato de Sódio	≥99,99%	NaNO ₃	Merck
Sulfato de Zinco hepta-hidratado	99,5-103%	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Merck
Tetraborato de Sódio	≥98%	Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	Merck

Figura 4.1- Tabela de reagentes usados e as respectivas especificações.

4.3 Soluções

Durante este trabalho foram preparadas e utilizadas diversas soluções: soluções padrão de nitrato de potássio (KNO₃), nas concentrações: de 1 mg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 8 µg/mL, 6 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL e 1 µg/mL, soluções padrão de nitrato de sódio (NaNO₃), nas concentrações: de 1 mg/mL, 100 µg/mL, 6 µg/mL e de 2 µg/mL, solução de Bórax (saturada), solução Carrez I, solução Carrez II e solução tampão de fosfato de potássio (0,045M, pH 3).

4.4 Amostras

As amostras a analisar foram previamente tratadas no âmbito do projeto TDSExposure, e foram congeladas a ± -20°C até serem analisadas. Foram analisadas amostras de diversas matrizes, nomeadamente Bebidas alcoólicas; Gorduras e óleos animais e vegetais; Café, cacau, chá e infusões; Pratos compostos; Ovos e ovoprodutos; Peixe, produtos de pesca, anfíbios, répteis e invertebrados; Fruta e produtos da fruta; Cereais e produtos à base de cereais; Carne e produtos cárneos; Leite e produtos lácteos; Produtos para dietas não padronizadas, substitutos e suplementos alimentares ou agentes fortificantes; Temperos, molhos e condimentos; Açúcar, confeitaria e sobremesas doces à base de água; Água e outras bebidas à base de água (Anexo I).

4.5. Procedimento Experimental

Com o objetivo de determinar os níveis de nitratos existentes nas amostras alimentares do projeto TDS, utilizou-se um procedimento acreditado no INSA e descrito em Vasco e Alvito, 2011.

Este método foi inicialmente validado para a análise de alimentos comerciais infantis (refeições preparadas, purés de fruta e sumos) e mais tarde para produtos hortícolas e frutos seguindo o protocolo padrão do laboratório. Foram avaliados e validados os parâmetros linearidade, gama de trabalho, limites de deteção e quantificação, recuperação, repetibilidade, precisão e exatidão. Neste estudo, o método foi validado para alimentos do grupo de “Pratos compostos”, de “Água e outras bebidas à base de água” e de “Raízes ou tubérculos amiláceos e produtos derivados, plantas sacarinas” através de testes de repetibilidade e precisão.

Os nitratos presentes nas amostras analisadas são extraídos com água fervente e uma solução de bórax, as substâncias interferentes são removidas por clarificação com soluções de Carrez. A separação do nitrato é efetuada por HPLC (com coluna de troca aniónica) e deteção em UV. A determinação do teor de nitrato é efetuada por intermédio de uma curva de calibração obtida com padrões, de diferentes concentrações de nitrato – método do padrão externo. O ião NO_3^- é identificado através do tempo de retenção do pico, comparando o cromatograma da amostra com o do padrão.

4.5.1. Preparação das soluções

4.5.1.1. Tampão fosfato de potássio 0,045 M pH3 (fase móvel)

Na preparação do tampão pesou-se 10,8872g de fosfato de potássio e diluiu-se em água num balão volumétrico de 2000 mL, posteriormente acertou-se o pH para 3 com adição de ácido Ortofosfórico. Seguiu-se então para uma filtração a vácuo com o auxílio de um filtro orgânico, finalizando com uma desgaseificação durante aproximadamente 30min.

4.5.1.2. Solução de bórax saturada

Sendo que a solubilidade do bórax é de 1g em 16mL de água, e que se quer uma solução de bórax saturada, adicionou-se mais do que 1g de bórax a cada 16ml de água.

4.5.1.3. Solução de Carrez I

Diluiu-se 15g de hexacioanoferrato (II) de potássio tri-hidratado, num balão volumétrico de 100mL, em água. Esta solução tem uma estabilidade de 6 meses aquando armazenada a uma temperatura de $5\pm 3^\circ\text{C}$.

4.5.1.4. Solução de Carrez II

Diluiu-se 30g de sulfato de zinco hepta-hidratado, num balão volumétrico de 100mL, em água. Esta solução tem uma estabilidade de 6 meses quando armazenada a uma temperatura de $5\pm 3^\circ\text{C}$.

4.5.2. Preparação das soluções padrão de calibração

4.5.2.1. Soluções de padrão de referência

Na preparação da solução-mãe de padrão de referência (1 mg/ml), pesou-se 0,1630g de KNO_3 para 100 ml de solução de tampão de fosfato de potássio a 0,045M a pH=3. Para a realização da curva de calibração, foi efetuada uma solução intermédia, diluindo-se de 1:100 a solução mãe. A partir da solução intermédia foram então preparadas 6 soluções correspondentes à curva de calibração. Em seis balões volumétricos certificados de 10ml foram medidos 1 mL, 2 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL e 10mL, correspondentes a concentrações de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respetivamente.

4.5.2.2. Soluções de padrão de controlo

Na preparação da solução de padrão de referência (1 mg/ml), pesou-se 0,1371g de NaNO_3 para 100 mL de solução de tampão de fosfato de potássio a 0,045M a pH=3. Para a realização dos pontos de controlo, foi realizada uma solução intermédia, diluindo-se de 1:100 a solução mãe. A partir da solução intermédia foram então preparadas 2 soluções correspondentes pontos de controlo. Em dois balões volumétricos certificados de 10 mL foram medidos 2 mL e 6 mL, correspondentes a concentrações de 2 e 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respetivamente.

4.5.3. Preparação das amostras

As soluções de amostra foram preparadas a partir das amostras previamente descongeladas. Foram pesados entre 5-20 g de amostra numa balança analítica, sendo esta quantidade dependente da quantidade de nitratos existentes na amostra a analisar. Cada amostra foi preparada em triplicado, ou seja, para cada amostra foram pesadas três tomas, sendo adicionado a uma delas uma solução padrão de referência com o objetivo de determinar a taxa de recuperação do analito em estudo. Adicionou-se de seguida 100 mL de água a aproximadamente 70°C, e 5 mL de solução Bórax saturada, com agitação no intervalo entre as duas adições. Posteriormente, as soluções foram submetidas a um banho de água fervente com sistema de condensação, durante 15min, sendo posteriormente retiradas e acrescentadas, ainda a quente, de 5 mL de Carrez I e de 5 mL de Carrez II, intervalando a adição com agitação. Transferiu-se a solução, previamente arrefecida, para um balão volumétrico certificado de 200 mL, e aferiu-se com água. Seguiram-se duas filtrações, a primeira realizada com filtro de papel, e a segunda com filtro PET de 0,45 μm . Obtendo-se assim a amostra para análise (esquema 4.1).

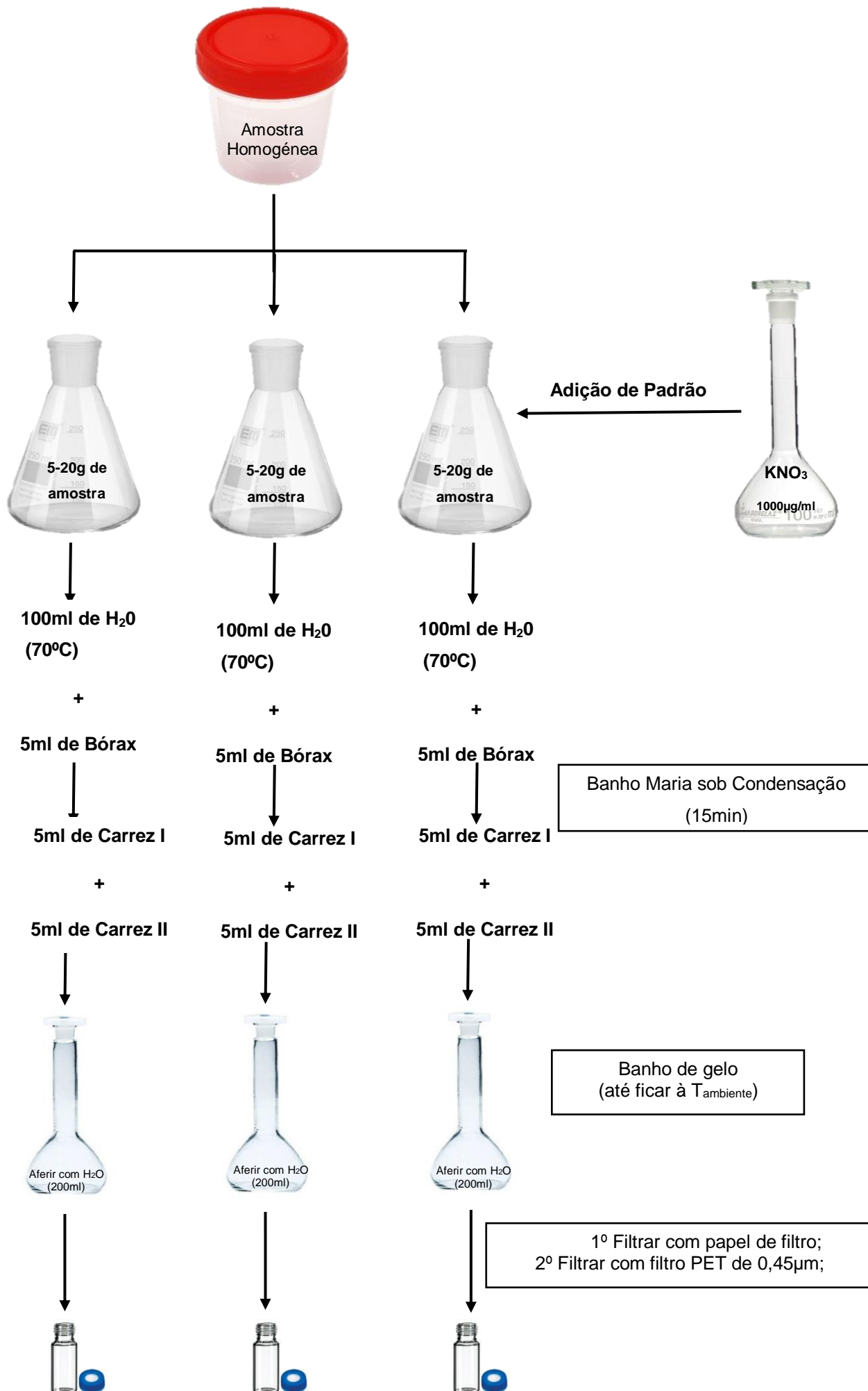


Figura 4.2- Esquema do procedimento para a preparação das amostras.

4.5.4. Condições Cromatográficas

As amostras e as soluções padrão foram colocadas em viais que posteriormente foram introduzidas no sistema de análise do HPLC. Nem todas as amostras apresentam as mesmas concentrações de analito, muitas das vezes não se encontram dentro dos limites da curva de calibração, sendo desta forma necessário diluir as amostras antes de injetar, ou, pelo contrário, ser necessário proceder-se à sua concentração, aumentando assim o volume de injeção ou a toma da amostra.

Fase estacionária: Coluna de troca aniônica, *Hypersil Sax*, com 5µm de porosidade e 25cm de comprimento por 4,6mm de diâmetro.

Fase móvel: Tampão de fosfato de potássio 0,045M, com pH≈3,0.

Fluxo: 1ml/min.

Volume de injeção: 20 µL (pode variar conforme a concentração da solução, entre 10-200µL).

Deteção: 210nm.

Temperatura de forno da coluna: 37 °C.

Temperatura da câmara das soluções a injetar: 15 °C.

Tempo de corrida: ±8 min para padrões e ± 15 min para as amostras.

Foram sempre realizadas 2 injeções de cada amostra.

4.5.5. Identificação e quantificação do teor de analito

De forma a identificar o pico do ião nitrato (NO₃⁻) foi realizada uma comparação entre os cromatogramas das soluções de padrão de referência e o das soluções de amostra, tendo como referência os tempos de retenção dos picos obtidos. É devido à probabilidade de existência de algumas dúvidas em relação ao pico do ião NO₃⁻ que também se realiza uma toma com adição de padrão, este que vai assim intensificar o pico do ião.

A quantificação foi baseada num método de padrão externo multinível (6 pontos). As curvas de calibração foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados pelo software “Empower” instalado no equipamento de cromatografia “Waters” utilizado. Neste software as áreas dos picos das amostras foram interpoladas na curva de calibração respetiva, sendo que a concentração final de nitrato foi calculada tendo em consideração o resultado obtido pelo software, a toma de amostra e as diluições ou concentrações efetuadas, conforme a equação 25.

$$Nit = \frac{C_{inj} \times V_{dil}}{m \times d} \times 100 \quad (\text{equação 25})$$

onde Nit é a concentração final de nitrato na amostra ($\mu\text{g}/\text{kg}$), C_{inj} é a concentração da solução analisada no cromatógrafo ($\mu\text{g}/\text{mL}$), V_{dil} é o volume em que a toma de amostra foi diluída (mL), m é a massa da toma de amostra (g) e d é a diluição efetuada na solução para análise.

As curvas de calibração obtidas só puderam ser utilizadas para o cálculo da concentração das amostras quando $r^2 \geq 0,995$, sendo r o coeficiente de correlação da curva de calibração e os resíduos tiveram um valor \leq a 10%. O resultado para o parâmetro Nitrato é expresso em mg/kg de amostra e apresentado com 2 algarismos significativos.

A percentagem de recuperação do nitrato adicionado a uma das tomas foi calculada segundo a equação 26.

$$Rec (\%) = \left(\frac{C_{inj} \times V_{dil}}{d} - m \times Nit \right) \times 100 \div (Nit_{padr\tilde{a}o} \times Vol_{adic}) \quad (\text{equação 26})$$

sendo Rec (%) a percentagem de recuperação, C_{inj} a concentração da solução analisada no cromatógrafo ($\mu\text{g}/\text{mL}$), V_{dil} o volume em que a toma de amostra foi diluída (mL), d a diluição efetuada na solução para análise, m a massa da toma de amostra (g), Nit a concentração final de nitrato na amostra ($\mu\text{g}/\text{kg}$), $Nit_{padr\tilde{a}o}$ a concentração da solução padrão de nitrato ($\mu\text{g}/\text{mL}$) e Vol_{adic} o volume de solução padrão de nitrato adicionado (mL).

4.5.6. Critério de aceitação dos resultados

A validação dos resultados é baseada na norma ISO-5725-6:1994 considerando o CV_r de 5%, por defeito.

A repetibilidade dos resultados, ou seja, a duplicação das amostras é utilizada de forma a se confirmar se a repetibilidade dos dados é obtida, de acordo com as equações 27, 28 e 29.

$$|X_1 - X_2| \leq r \Leftrightarrow r = 2,8\sigma_r \quad (\text{equação 27})$$

Onde se tem que:

$$\sigma_r = \frac{CV_r \cdot x}{100} \quad (\text{equação 28})$$

$$x = \frac{X_1 + X_2}{2} \quad (\text{equação 29})$$

onde, x_1 corresponde ao resultado da primeira toma e x_2 da segunda toma. Se, $|X_1 - X_2| \leq r$ então tem-se que a repetibilidade é verificada e o resultado final é de x , caso isto não se verifique, a repetibilidade não é verificada e tem que se repetir mais duas tomas, respetivamente, x_3 e x_4 . Quando

a amostra é repetida em quadruplicado, verifica-se se a precisão intermédia é cumprida através da equação 30.

$$|X_{m\acute{a}x} - X_{m\acute{i}n}| \leq P_i \Leftrightarrow P_i = 3,6\sigma_r \quad (\text{equa\c{c}\~{a}o 30})$$

Onde, o $X_{m\acute{a}x}$ e $X_{m\acute{i}n}$, correspondem ao valor m\acute{a}ximo e ao m\acute{i}nimo, respetivamente dos valores observados das quatro repeti\c{c}\~{o}es. Se, a diferen\c{c}\~{a} obtida entre o valor m\acute{a}ximo e m\acute{i}nimo forem inferiores ou iguais a P_i , ent\~{a}o a precis\~{a}o interm\~{e}dia \e{e} verificada e o resultado corresponde \a{ m\~{e}dia das quatro medi\c{c}\~{o}es, por outro lado, se a diferen\c{c}\~{a obtida for superior a P_i , ent\~{a}o a precis\~{a}o interm\~{e}dia n\~{a}o \e{e} verificada e o resultado corresponde \a{ mediana.

Para a aceita\c{c}\~{a}o dos valores de concentra\c{c}\~{a}o dos pontos de controlo obtidos experimentalmente foi utilizado um coeficiente de varia\c{c}\~{a}o de 10%, em rela\c{c}\~{a}o aos valores te\~{o}ricos preparados (2 e 6 $\mu\text{g/mL}$).

Relativamente \a{ recupera\c{c}\~{a}o obtida nas an\~{a}lises, esta \e{e} feita com base no regulamento (CE) N\~{o} 1882/2006 onde est\~{a} descrito que quando a concentra\c{c}\~{a}o de nitratos \e{e} inferior a 500mg/kg, o intervalo aceite para o valor da recupera\c{c}\~{a}o varia entre 60-120%, mas para quando a concentra\c{c}\~{a}o de nitratos \e{e} superior ou igual a 500mg/kg o intervalo de aceita\c{c}\~{a}o varia entre 90-110% (Uni\~{a}o Europeia, 2006).

4.5.7. Processo de valida\c{c}\~{a}o do m\~{e}todo

A valida\c{c}\~{a}o do m\~{e}todo foi obtida com base na avalia\c{c}\~{a}o de diversos par\~{a}metros: especificidade, seletividade, gama de trabalho, linearidade do m\~{e}todo na gama de trabalho validado, sensibilidade, limites anal\~{i}ticos (LOD e LOQ), repetibilidade e linearidade do injetor, repetibilidade, precis\~{a}o interm\~{e}dia, exatid\~{a}o e incerteza. Alguns destes par\~{a}metros foram previamente validados, por Vasco & Alvito, (2011).

Utilizou-se a gama de trabalho j\~{a} validada em, Vasco & Alvito, (2011), apenas se verificou regularmente se as curvas de calibra\c{c}\~{a}o utilizadas cumpriam os crit\~{e}rios de valida\c{c}\~{a}o do $r^2 (>0,995)$, r\~{e}s\~{i}duos $<10\%$.

Durante este trabalho, avaliaram-se os seguintes par\~{a}metros:

Repetibilidade: atrav\~{e}s da elabora\c{c}\~{a}o de 6 r\~{e}plicas de cada amostra, determinou-se o desvio padr\~{a}o relativo da repetibilidade (RSD_r).

Precis\~{a}o interm\~{e}dia: atrav\~{e}s de 3 repeti\c{c}\~{o}es do estudo da repetibilidade, em tr\~{e}s dias diferentes, determinou-se o desvio padr\~{a}o relativo da precis\~{a}o interm\~{e}dia (RSD_R).

Exatid\~{a}o: atrav\~{e}s do valor do z-score determinado em ensaios interlaboratoriais (FAPAS).

4.5.8. Controlo Qualidade Interno

Repetibilidade do injetor – o coeficiente de variação da repetibilidade do injetor foi calculado através de 10 injeções sucessivas das soluções padrão correspondentes aos extremos da gama de trabalho (1 e 10 µg/mL). Segundo o protocolo de controlo de qualidade interno estabelecido pelo INSA, o coeficiente de variação tem de ser inferior a 5% (ACF, 2016).

Linearidade do injetor - obteve-se através de sucessivas injeções de uma amostra padrão, com diferentes volumes de injeções (10-200µL). Efetuou-se uma regressão linear volume/área do pico, para se obter o coeficiente de determinação, que ao ser superior a 0,995 mostra que existe linearidade no injetor.

4.5.9. Estudos de estabilidade

O estudo da estabilidade foi realizado através da comparação entre curvas preparadas no primeiro e sétimo dia com uma curva preparada no primeiro dia.

5. Resultados e Discussão

5.1. Critérios de Validação

Como já foi referido, com o objetivo de determinar os níveis de nitratos existentes nas amostras alimentares do projeto TDS, utilizou-se um procedimento acreditado no INSA e descrito em Vasco e Alvito, 2011.

A curva de calibração (1, 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g/mL}$) preencheu todos os requisitos, mostrando linearidade na gama de aplicação (1-10 $\mu\text{g/mL}$), com um coeficiente de determinação (r^2) de 0,9999 (Anexo VII), um coeficiente de variação do método de 0,63, e um PG (0,05) < F (10,13) em conformidade com teste Mandel. O teste RIKILT apresentou todos os pontos entre o limite superior (110%) e o limite inferior (90%) com um critério de aceitação de 10% e todos os valores residuais eram inferiores a 10% (1,6 a 2,1%). O valor do teste PG para a homogeneidade das variâncias (5,14) foi menor do que o F valor tabelado (5,35), que confirmou a gama de trabalho. Os valores de limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) da curva de calibração foram de 0,1 e 0,3 $\mu\text{g/mL}$, que refletem os níveis de nitrato nas amostras de 1 e 3 mg/kg, respetivamente. Para fins práticos, o primeiro ponto de calibração da curva (1 $\mu\text{g/mL}$) (figura 5.1) foi considerado para calcular o limite de quantificação do método que corresponde a 10 mg/kg, sendo o valor do limite de deteção 1/3 correspondendo a 3,3 mg/kg (Vasco & Alvito, 2011). A incerteza do método é de 17%.

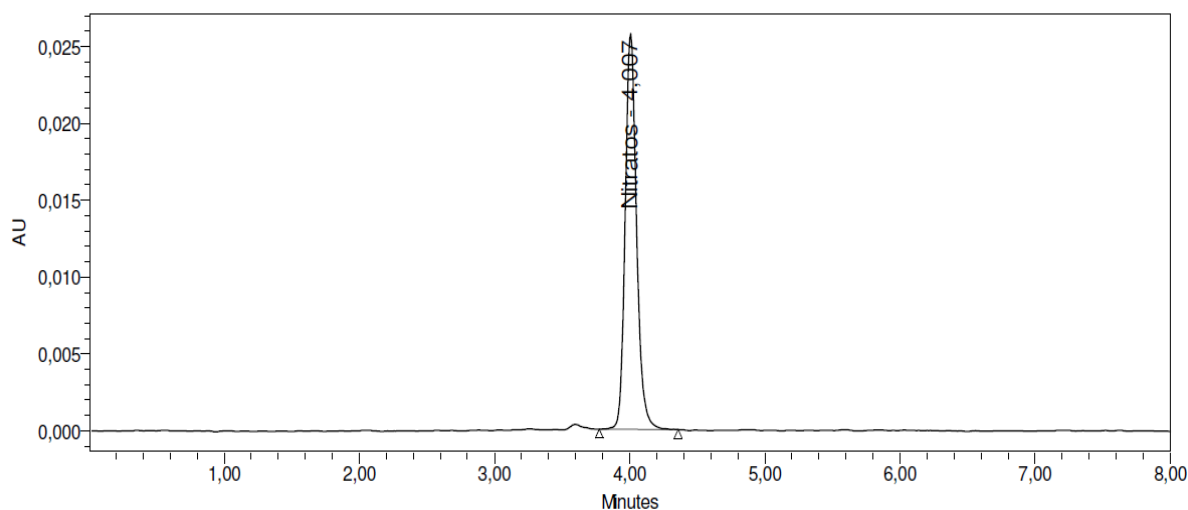


Figura 5.1 – Cromatograma do primeiro ponto da curva de calibração (1 $\mu\text{g/mL}$).

5.1.1. Precisão

Neste estudo foram avaliados a repetibilidade e a precisão intermédia. A repetibilidade, consiste na análise de seis tomas da mesma amostra, realizadas pelo mesmo(a) analista, equipamento, mesmo dia, resumindo, nas mesmas condições operatórias. Por outro lado, a precisão intermédia, consiste exatamente no mesmo tipo de metodologia, mas três ensaios iguais em três dias diferentes. Neste projeto, estudámos a repetibilidade e a precisão intermédia de 3 amostras de 3 grupos diferentes: Caldo Verde (Grupo 5- **Pratos Compostos**), Batata Cozida (Grupo 17- **Raízes ou tubérculos amiláceos e produtos derivados, plantas sacarinas**) e Coca-Cola (Grupo 20- **Água e outras bebidas à base de água**). No anexo IV, V e VI estão apresentadas a folha de cálculo das concentrações das seis tomas referentes à repetibilidade, e as folhas de cálculo para o desvio padrão relativo da repetibilidade ($RSD_r(\%)$) (equação 17) e da precisão intermédia ($RSD_R(\%)$) (equação 18), respetivamente. Os resultados encontram-se sumarizados na figura 5.2.

Amostras	$RSD_r(\%)$	$RSD_R(\%)$
Caldo Verde – “Pratos Compostos”	3,0 a 8,9	8,2
Batata Cozida – “Raízes ou tubérculos amiláceos e produtos derivados, plantas sacarinas”	0,6 a 2,8	2,6
Coca-Cola – “Água e outras bebidas à base de água”	2,8 a 6,3	6,1

Figura 5.2 – Tabela que apresenta o desvio padrão relativo da repetibilidade ($RSD_r(\%)$) e da precisão intermédia ($RSD_R(\%)$) calculados para as três amostras testadas.

O critério de aceitação dos resultados, baseado no procedimento dos Nitratos, tem por defeito que o coeficiente de variação aceitável é de 5%. No entanto, com base nos valores obtidos neste estudo e em outros anteriores (Vasco & Alvito, 2011; Laia, Serra, & Vasco, 2017), obtiveram-se valores superiores para o RSD_R , pelo que neste estudo o coeficiente a utilizar para a determinação das amostras do estudo do TDS foi de 10% (maior valor obtido nos diferentes estudos de Precisão Intermédia).

5.1.2. Exatidão

Para a avaliação da exatidão do método foi efetuada uma análise de um teste Interlaboratorial FAPAS de puré de couve (FAPAS 15129) contendo 310 mg/kg de nitratos. Esta análise foi efetuada segundo o procedimento descrito anteriormente. A avaliação da exatidão foi feita através do cálculo do fator do desempenho z-score, utilizando a equação 20, que de acordo com a sua escala de pontuação, apresenta uma exatidão satisfatória quando z, em módulo, é inferior ou igual a 2. A figura 5.3 resume os resultados obtidos para este ensaio. Com base neste resultado pode-se concluir que o método é exato.

FAPAS (15129) Puré de Couve	Valor Alvo (mg/kg)	Valor Obtido (mg/kg)	Desvio-padrão	z-score
	334	310	22,3	-1,1

Figura 5.3 – Tabela representativa do resultado ao teste interlaboratorial FAPAS.

5.2. Controlo de Qualidade Interno

5.2.1. Repetibilidade e Linearidade do Injetor

A conformidade do injetor do sistema de HPLC é um parâmetro complementar ao processo de validação, no entanto é importante para avaliar se este se encontra bem calibrado e para determinar o erro associado às injeções efetuadas. Deste modo, avaliaram-se a repetibilidade e a linearidade do injetor.

O estudo da repetibilidade, consistiu em 10 injeções sucessivas, das soluções padrão correspondentes aos extremos da gama de trabalho, 1 µg/mL e 10 µg/mL (figura 5.4). Este estudo foi baseado num protocolo já existente no INSA, que refere que o coeficiente de variação deve ser inferior a 5% (DAN URQ - IT221_04 L).

Nº Repetições	Área do pico	
	1µg/mL	10µg/mL
1	197797	1482297
2	198031	1481024
3	197431	1482737
4	197168	1481828
5	197113	1482026
6	198352	1481439
7	197928	1481396
8	197694	1483416
9	198628	1482723
10	197928	1481922
Média	197807	1482081
S	482	727
RSD(%)	0,24	0,05

Figura 5.4 – Tabela do cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação, das áreas dos picos em função do número de injeções.

Os resultados obtidos, calculados pela equação 16, foram inferiores a 5%, de acordo com o protocolo do INSA (DAN URQ - IT221_04 L), o que mostra que o injetor apresentava uma repetibilidade admissível.

Em seguida, efetuou-se o estudo da linearidade, através da análise da capacidade de resposta do injetor em função da variação dos volumes injetados. Este estudo é realizado através de sucessivas injeções de uma amostra padrão, com diferentes volumes de injeções (10-200µL). Os resultados obtidos estão apresentados na figura 5.5.

De acordo com os valores da figura 5.5, foi realizada uma regressão linear para obter a correlação entre o volume de padrão injetado e a média das áreas (para cada volume), com o objetivo de se calcular o coeficiente de determinação.

Volume(μ L)	Área do Pico		
	1ª injeção	2ª injeção	Média
10	318208	318868	318538
20	638738	639885	639312
40	1281852	1282419	1282136
60	1922831	1923148	1922990
80	2556711	2556805	2556758
100	3191050	3189973	3190512
120	3828380	3827485	3827933
140	4469754	4468888	4469321
160	5095928	5099274	5097601
180	5732827	5732602	5732715
200	6367107	6366049	6366578

Figura 5.5 – Tabela com as áreas do pico, em função dos volumes injetados, da solução padrão de 4 μ g/mL e correspondente média.

A seguinte figura (5.6), mostra uma relação proporcional entre o volume injetado e área do pico obtido, com um coeficiente de determinação de 1, superior ao mínimo exigido de 0,995, para a linearidade do injetor. Concluindo, o injetor encontra-se em perfeitas condições, o que permite a sua utilização para a diluir ou concentrar as amostras a analisar, quando necessário e no intervalo de 10 a 200 μ L.

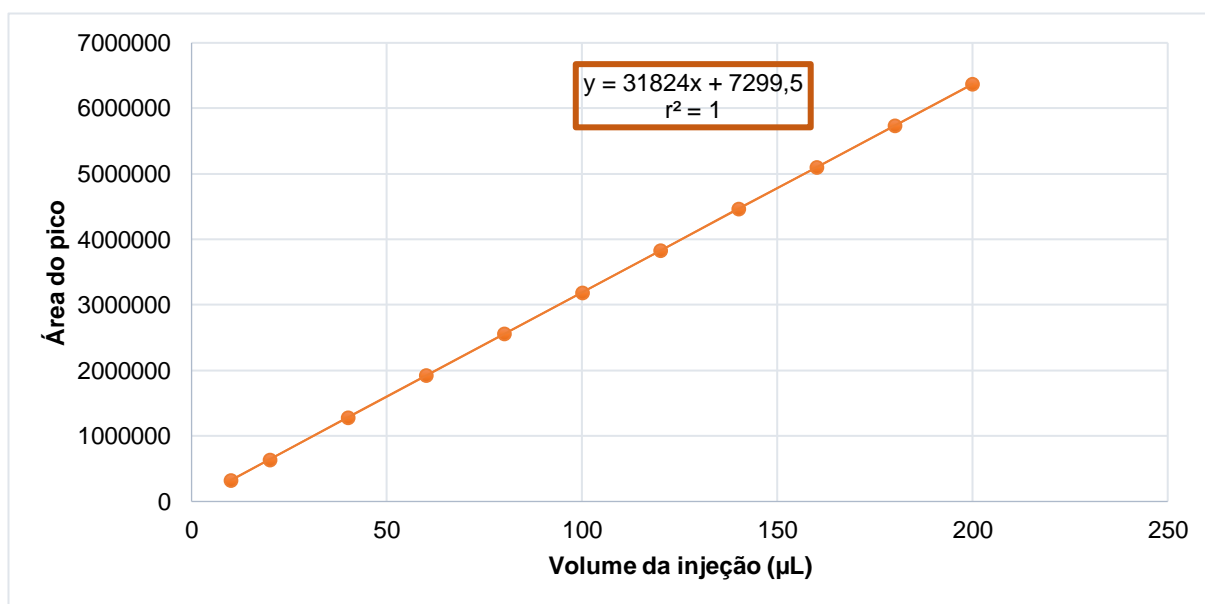


Figura 5.6 – Gráfico correspondente à respetiva regressão linear para obtenção do coeficiente de determinação (r^2), baseado na relação entre o volume injetado e a área do pico (sinal obtido no cromatogramas).

5.3. Estudo da Estabilidade da Curva

Com o objetivo de testar a estabilidade da curva de calibração, efectuaram-se curvas de calibração em dias diferentes para se efetuar uma comparação. No primeiro dia foram realizadas 3 curvas de calibração, duas delas a partir da mesma solução stock, das quais uma foi posteriormente armazenada a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante sete dias. No primeiro dia foram injetadas as duas curvas de soluções stock diferentes. No sétimo dia, foi realizada uma nova curva de calibração e injectada com a curva de calibração que esteve armazenada durante os sete dias.

Foram então analisados e comparados as áreas dos picos obtidos dos cromatogramas, das curvas de calibração injetadas no dia 1 com as do dia 7.

Pela análise da figura 5.7 e 5.8, consegue-se verificar que ambas as curvas de calibração, apresentam um coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,995, sendo considerado um modelo linear bastante adequado

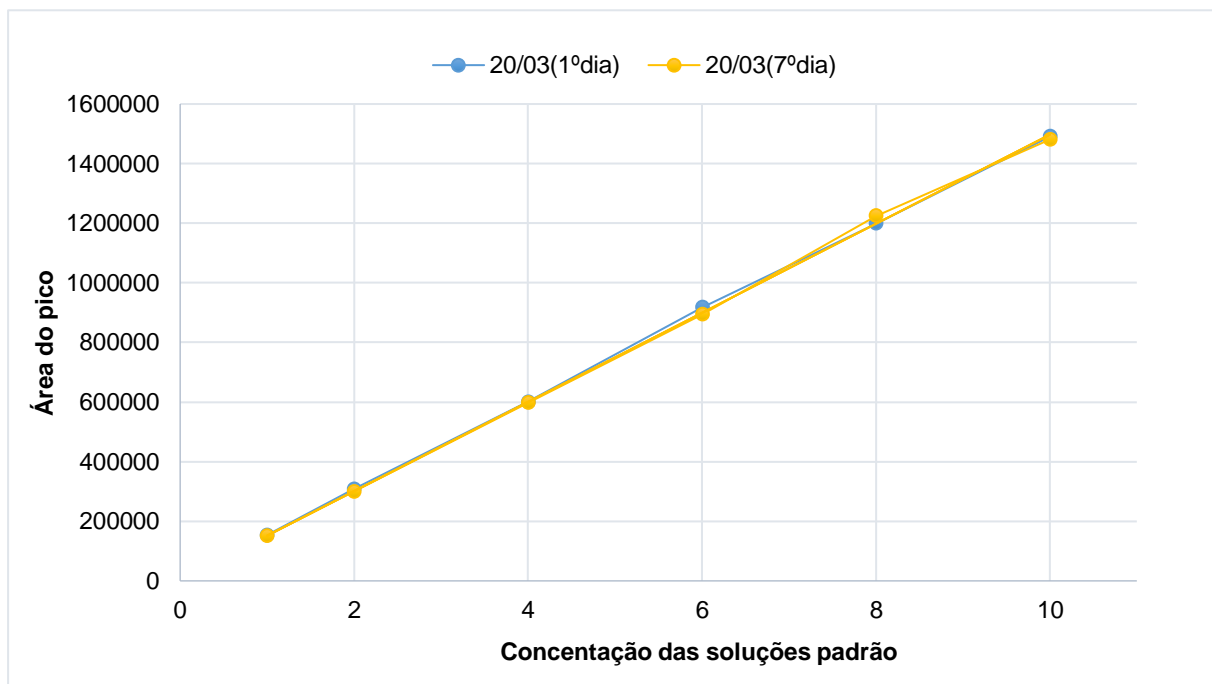


Figura 5.7- Gráfico correspondente à respetiva regressão linear da relação entre as áreas dos picos e a concentração das soluções da curva de calibração, preparadas no primeiro dia, e injetadas no primeiro e sétimo dia a partir da mesma solução stock.

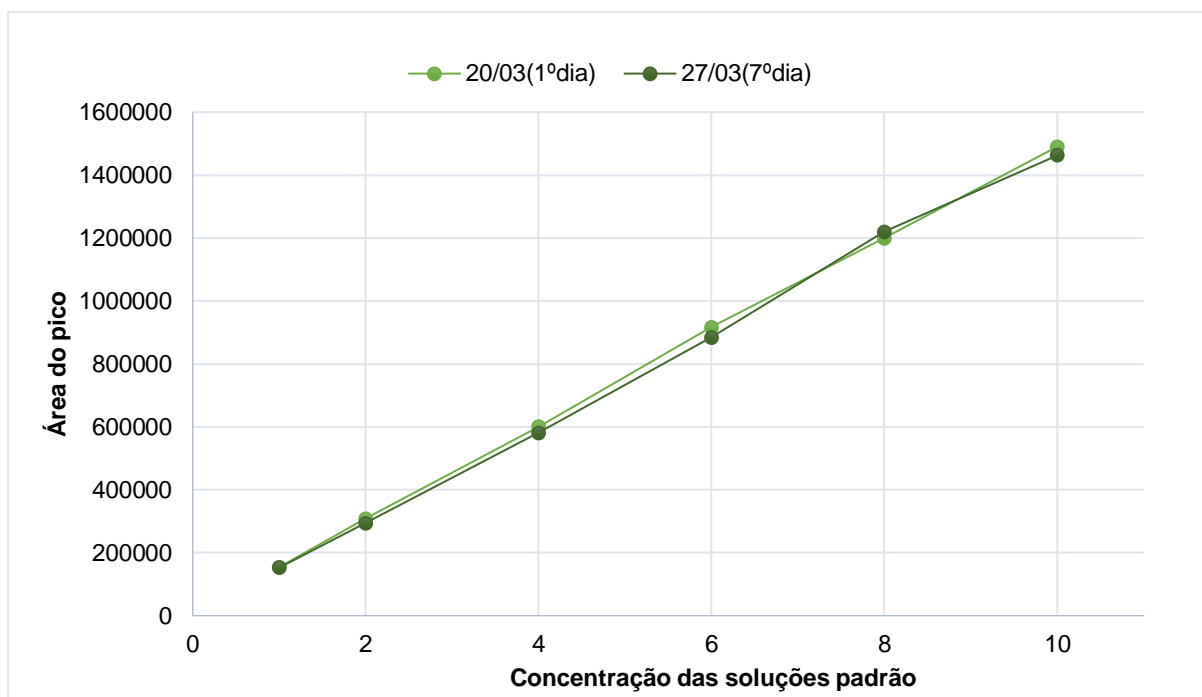


Figura 5.8- Gráfico correspondente à respetiva regressão linear da relação entre as áreas dos picos e a concentração das soluções da curva de calibração, preparadas no próprio dia da injeção, a partir de soluções stock diferentes.

De forma a se perceber se é necessário ou não realizar a curva de calibração todos os dias, seguiu-se para a realização de um estudo de distribuição *t-student*. A distribuição *t-student* consiste num estudo baseado num teste de hipóteses, que determina se se deve aceitar ou rejeitar a hipótese nula, isto é, se a nossa amostra está dentro do intervalo de confiança (95%), ou não.

Temos que:

H₀: diferença entre realizar todos os dias e só uma vez por semana = 0

H_a: diferença entre realizar todos os dias e só uma vez por semana ≠ 0

Se H₀ for igual a zero, significa que não existe diferença entre fazer a curva de calibração todos os dias e utilizar a mesma durante uma semana. Por outro lado, H_a, diferente de zero, significa que existe diferença entre fazer todos os dias a curva de calibração e fazer apenas no início da semana. Desta forma, se o p-value calculado for inferior a 5% (fora do intervalo de confiança), a hipótese nula é rejeitada, por outro lado, se não for rejeitada, significa que não existem diferenças entre fazer a curva de calibração apenas uma vez por semana e todos os dias.

Dias	Realizada no próprio dia		Realizada no primeiro dia	
	1	7	1	7
Média das áreas	1490579	1464706	1490579	1480843
Área 1	1492719	1465919	1492719	1481588
Área 2	1488439	1463492	1488439	1480097

Figura 5.9 – Tabela correspondente às áreas dos picos, da solução do extremo máximo da gama de trabalho (10 µg/ml), das soluções preparadas no dia 1 e dia 7, preparadas no próprio dia da injeção e preparadas no primeiro dia.

teste t-student	0,181957731
------------------------	--------------------

Figura 5.10 – Tabela com o resultado obtido do estudo da distribuição *t-student*.

De acordo com a análise realizada pelo teste t-student (figura 5.9), com base na média das áreas dos picos, do extremo máximo (10 µg/ml) da curva de calibração (figura 5.10), determinou-se que o valor é superior a 5% (dentro do intervalo de confiança >0,05), assim sendo, não se rejeita a hipótese nula, o que quer dizer não existe diferença entre preparar a curva de calibração uma vez por semana e todos os dias.

5.4. Análise das Amostras

Após as etapas de validação do método, seguiu-se para a determinação do teor em nitrato nas amostras em estudo.

Durante este trabalho, foram analisadas 127 amostras, de 14 matrizes alimentares diferentes, codificadas segundo o FoodEx2 (Anexo I). Algumas amostras foram realizadas em triplicado, e na terceira toma foi adicionada uma quantidade conhecida da solução KNO_3 (1000 $\mu\text{g/mL}$), tal como explicado no procedimento. A partir destas 3 tomas, foi possível calcular o teor de nitratos existentes na amostra e a taxa de recuperação (folha de cálculo – Anexo II). Por outro lado, as restantes amostras foram analisadas como forma de triagem, sendo apenas realizada uma toma, sem cálculo de taxa de recuperação. Apenas para confirmação do pico do nitrato no cromatograma, a amostra foi colocada em dois frascos, onde foi adicionada uma pequena quantidade de padrão ao segundo vial.

O coeficiente de variação da repetibilidade, de 5%, é utilizado por defeito com base na norma ISO 5727-6:1994, no entanto, os estudos de repetibilidade e precisão intermédia realizados no âmbito da validação do método determinaram um valor de 10%, que foi utilizado como critério de aceitação da repetibilidade entre as duas tomas de amostra (ISO, 1994).

Entre as amostras alimentares analisadas, pertencentes aos grupos 2, 3, 4, 6, 7, 13, 14, 15, 16, 18 e 20, algumas encontram-se abaixo do limite de deteção e outras do limite de quantificação.

Os resultados obtidos da determinação do teor médio de nitratos das amostras do grupo 2, 3, 4, 6, 14 e 15, correspondentes, ao grupo de Bebidas Alcoólicas, Gorduras e óleos animais e vegetais, café, cacau, chá e infusões, Ovos e ovoprodutos, Leite e produtos lácteos e Produtos para dietas não padronizadas, substitutos e suplementos alimentares ou agentes fortificantes, respetivamente, estão apresentados nas figuras 5.11, 5.12, 5.13, 5.14, 5.15 e 5.16

Grupo 2			
TDS Amostra	Amostra	Nº de tomas	Resultado final (mg/kg)
1	Cerveja	1	<LOD
2	Vinho Verde Branco, branco, tinto	1	<LOD

Figura 5.11 – Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 2, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).

Grupo 3			
TDS Amostra	Amostra	Nº de tomas	Resultado final (mg/kg)
3	Azeite	1	<LOD
4	Manteiga com sal	1	<LOD

Figura 5.12 – Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 3, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).

Grupo 4

TDS Amostra	Amostra	Nº de tomas	Resultado final (mg/kg)
5	Cacau em pó, chocolate em pó	1	<LOD
6	Café	1	<LOD
7	Chá	1	<LOD
8	Chá de ervas, chá de limão	1	<LOD

Figura 5.13- Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 4, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).

Grupo 6

TDS Amostra	Amostra	Nº de tomas	Resultado final (mg/kg)
44	Ovos	1	<LOD

Figura 5.14- Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 6, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).

Grupo 14

TDS Amostra	Amostra	Nº de tomas	Resultado Final (mg/kg)
126	Leite meio gordo e magro	1	<LOQ
127	Leite com cereais, leite com chocolate	1	<LOD
128	logurte natural, com aroma, com fruta (sólido e líquido)	1	<LOD
129	logurte probiótico, com aroma, com aroma líquido, com cereais, com fruta	1	<LOD
130	Queijo flamengo	1	<LOQ
131	Leite creme e pudim flan	1	<LOD

Figura 5.15- Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 14, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).

Grupo 15

TDS Amostra	Amostra	Nº de tomas	Resultado Final (mg/kg)
132	Soja à bolonhesa, hambúrguer soja	1	<LOD
133	Bebida de soja e baunilha, leite de soja	1	<LOQ

Figura 5.16- Resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 15, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).

Pela análise dos resultados obtidos das amostras do grupo 2, 3, 4, 6, 14 e 15, consegue-se observar que todas as amostras analisadas, exceto duas do grupo 14, e uma amostra do grupo 15, apresentam valores inferiores ao limite de deteção (3,3 mg/kg).

As outras três amostras do grupo 14, a 126 e 130, e do grupo 15, a 133, apresentam valores de concentração inferiores ao limite de quantificação (10 mg/kg).

Todas as amostras das respetivas tabelas, foram analisadas apenas com uma toma, não apresentando valor para a recuperação, como forma de triagem, e como se verificou, não apresentavam teores de nitratos detetáveis e quantificáveis.

Os resultados obtidos da determinação do teor médio de nitratos das amostras do grupo 5, apresentadas na figura 5.17, correspondente, ao grupo dos Pratos Compostos.

Grupo 5				
TDS	Amostra	Nº de tomas	Resultado final	Taxa de
Amostra			(mg/kg)	Recuperação (%)¹
9	Açorda, açorda à alentejana, de bacalhau, de marisco, migas	1	20	-
10	Puré de batata	1	47	-
11	Empadão de carne	1	10	-
12	Dobrada	1	14	-
13	Cozido à Portuguesa e cozido à Portuguesa com grão	1	86	-
14	Feijoada, sopa à lavrador, sopa da pedra, sopa de carne	1	<LOD	-
15	Rancho	1	87	-
16	Carne à bolonhesa, à jardineira, de porco à alentejana, papas de serrabulho, rojões	1	19	-
17	Hambúrguer de peru, de porco, de vaca	1	<LOQ	-
18	Almôndegas	1	<LOQ	-
19	Bacalhau com natas, desfeita de bacalhau	1	28	-
20	Arroz de gambas, de lapas, de marisco	1	14	-
21	Salada de atum, de bacalhau, de bacalhau e grão	1	80	-
23	Caldeirada de bacalhau, de enguias, de peixe, de safio	1	21	-
24	Empadão de atum, de bacalhau, de peixe	1	67	-
25	Arroz de bacalhau, de lulas, de peixe, de polvo, de tamboril	1	18	-
26	Quiche cogumelos e milho, espinafres, frango, vegetais, lorraine	1	37	-
27	Omelete	1	18	-
31	Lasanha bolonhesa e vegetariana	1	20	-
32	Arroz à valenciana	1	<LOQ	-
33	Arroz de cenoura, de ervilhas, de tomate, de vegetais, de feijão	1	<LOD	-

34	Arroz de cabidela, de frango, de pato	1	<LOQ	-
36	Sopa de couve e feijão, ervilhas, feijão, grão, grão com espinafres	1	63	-
37	Caldo verde	1	96	-
39	Canja de galinha	1	<LOQ	-
40	Creme de camarão, de marisco, sopa de peixe	1	23	-
42	Salada de alface e tomate	3	911	84
43	Salada russa	1	58	-

¹ Nota: Critério de aceitação se N<500 mg/kg (TR de 60-120%) e N>500 mg/kg (TR de 90-110%).

Figura 5.17- Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 5, respetivo número de tomas, resultado final (mg/kg) e taxa de recuperação (%).

No Grupo 5, estão exibidos resultados muito diferentes, respetivamente ao resultado final, tendo amostras (14 e 33) que apresentam valores abaixo do limite de deteção, uma vez que são inferiores a 3,3 mg/kg. Existem outras amostras (17, 18, 32, 34 e 39) que apresentam valores abaixo do limite de quantificação (10 mg/kg), não sendo quantificáveis neste estudo, devido ao limite de quantificação do método ser superior.

A amostra 42 (figura 5.19), Salada de Alface e Tomate, foi a única amostra que mostrou ter teores de nitratos consideravelmente elevados (>500 mg/kg), possivelmente devido à presença da alface. A alface é um hortícola folhoso, um dos alimentos com maior quantidade intrínseca de nitratos, estando legislado os seus limites máximos (Comissão Europeia, 2006). Contudo, esta amostra apresentou uma recuperação de 84% não sendo válida para o seu teor de nitratos (>500 mg/kg (90-110%)). Esta amostra terá de ser repetida de forma a cumprir todos os critérios de aceitação do método dos nitratos.

As restantes amostras apresentam concentrações finais entre 10-96 mg/kg, valores relativamente não prejudiciais à saúde pública (figura 5.18).

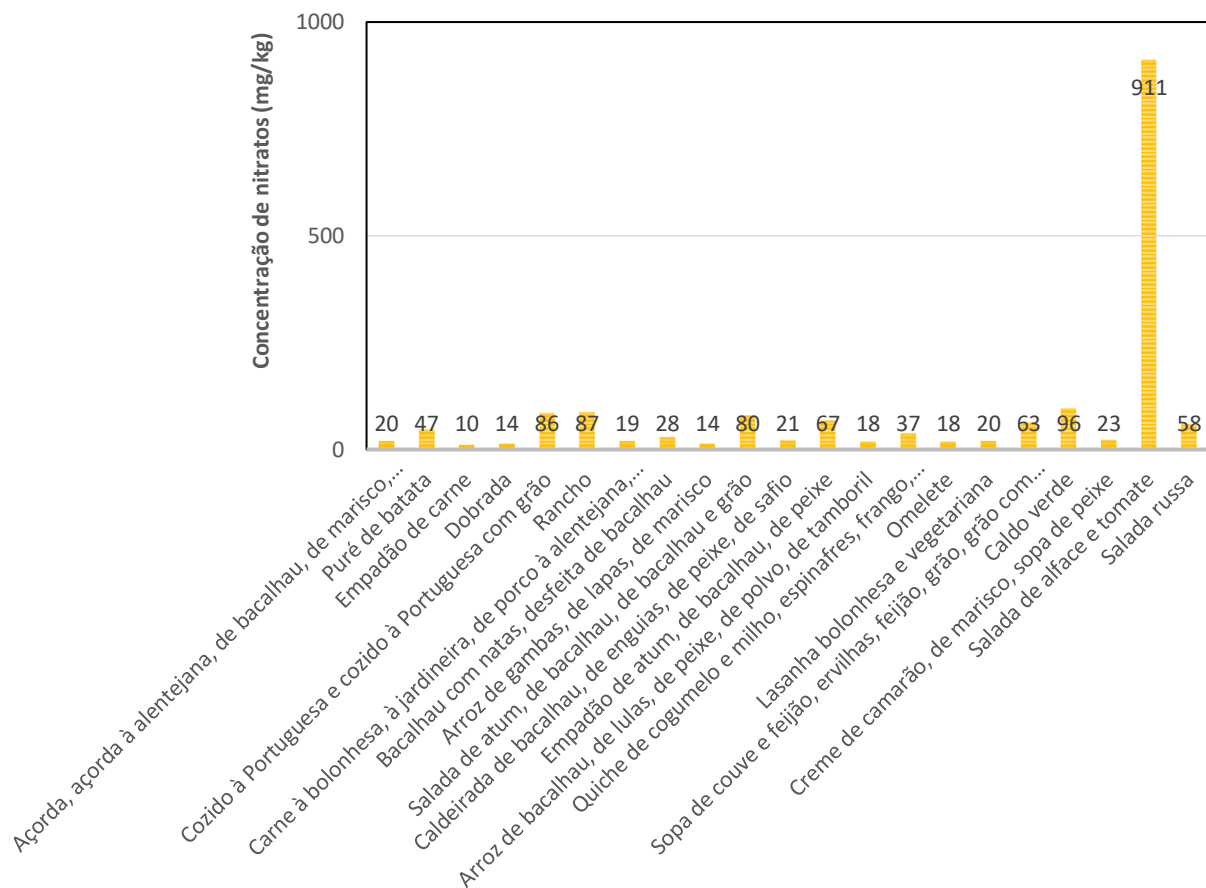


Figura 5.18- Gráfico representativo dos diferentes teores de nitrato nas amostras quantificáveis do grupo 5.

Apenas a amostra 42 foi efetuada com três tomas, as restantes amostras foram apenas efetuadas com uma toma, não apresentando assim valor para a recuperação. No anexo III, estão representados dois cromatogramas desta amostra, um com padrão e outro sem.

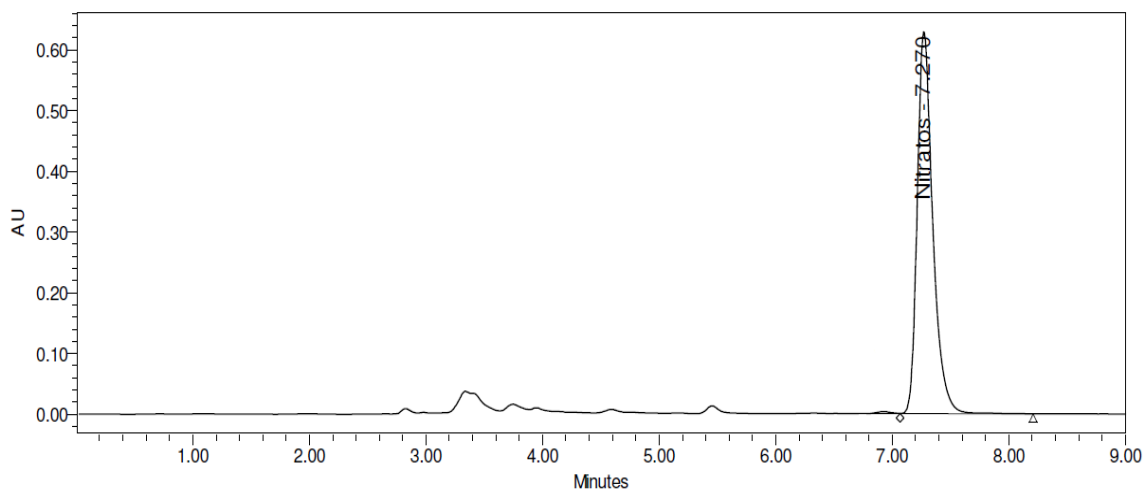


Figura 5.19 – Cromatograma da amostra “Salada de Alface e Tomate”.

Os resultados obtidos da determinação do teor médio de nitratos das amostras do grupo 7, apresentadas na figura 5.20, correspondente, ao grupo dos Peixes, produtos da pesca, anfíbios, répteis e invertebrados.

Grupo 7				
TDS Amostra	Amostra	Nº de tomas	Resultado final (mg/kg)	
56.4	Cavala	1	<LOQ	
57.2	Sardinha	1	11	
59	Abrótea, cantarilho, peixe vermelho	1	17	
60	Peixe espada	1	<LOQ	
62	Conquilhas e amêijoas	1	57	
64	Lulas, espetadas de lulas	1	23	
65	Bacalhau	1	<LOQ	

Figura 5.20 – Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 7, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).

Através da análise das 7 amostras do grupo 7, consegue-se observar que todas foram executadas apenas com uma toma, das quais, 3 se apresentam abaixo do limite de quantificação, e as restantes 4 apresentam teores de nitratos baixos (figura 5.21). Dentro dos teores apresentados neste grupo, temos a amostra de “conquilha e amêijoas” com o maior teor de nitratos, isto deve-se provavelmente à sua presença em rios, onde possam existir escoamentos de águas das agriculturas com fertilizantes azotados (Gabinetes dos Secretários de Estado do Ambiente e das Florestas e do Desenvolvimento Rural, 2018).

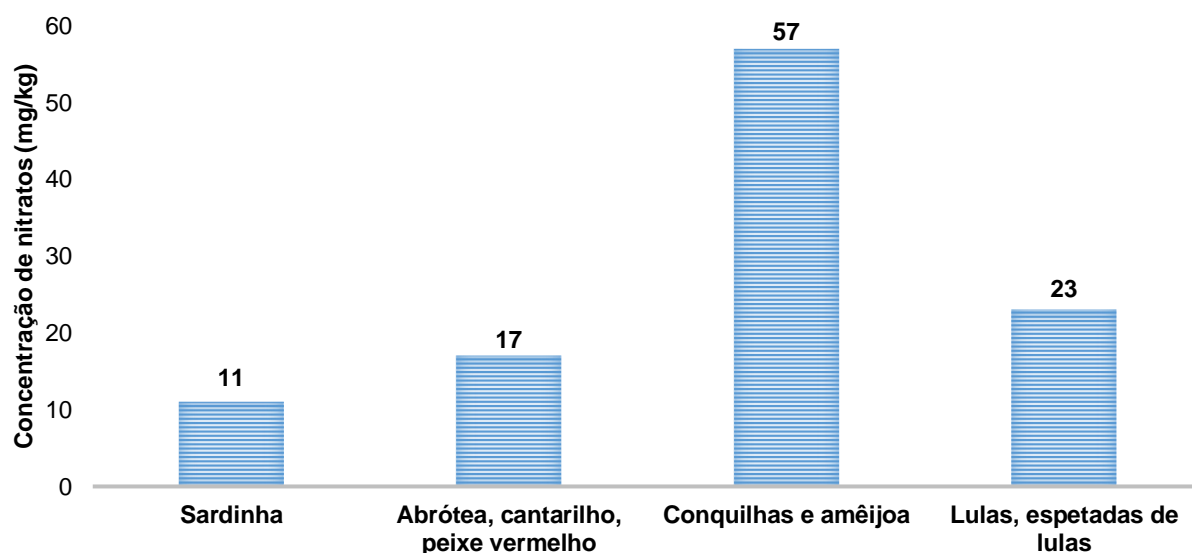


Figura 5.21- Gráfico representativo dos diferentes teores de nitratos nas amostras quantificáveis do grupo 7.

Relativamente ao grupo 9, o grupo da fruta e produtos da fruta, foram analisadas as amostras, apresentadas na figura 5.22, com a finalidade de obter o teor de nitratos.

Grupo 9				
TDS	Amostra	Nº de tomas	Resultado Final	Taxa de
Amostra			(mg/kg)	Recuperação (%)¹
70	Laranja	1	<LOD	-
70.2	Laranja	1	<LOD	-
70.3	Laranja	1	<LOD	-
70.4	Laranja	1	<LOD	-
71	Maça	1	<LOD	-
71.2	Maça	1	<LOD	-
71.3	Maça	1	<LOD	-
71.4	Maça	1	<LOD	-
72	Pêra	1	<LOD	-
72.2	Pêra	1	<LOD	-
72.3	Pêra	3	<LOD	-
72.4	Pêra	1	<LOD	-
73	Uva	3	<LOD	-
73.2	Uva	3	<LOD	-
73.3	Uva	3	<LOD	-
73.4	Uva	3	<LOD	-
74	Morango	3	114	93
78	Ananás	3	<LOD	-
79	Passas de uva	3	<LOQ	(106)
80	Figo seco	3	159	97
80.2	Figo seco	3	155	95
80.3	Figo seco	3	145	112
80.4	Figo seco	3	154	103
82	Salada de Fruta	3	43	110
82.2	Salada de Fruta	3	12	103
82.3	Salada de Fruta	3	76	98
82.4	Salada de Fruta	3	93	63
83	Pêssego e ananás em conserva	1	<LOD	-

¹ Nota: Critério de aceitação se N<500 mg/kg (TR de 60-120%) e N>500 mg/kg (TR de 90-110%).

Figura 5.22 – Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 9, respetivo número de tomas, resultado final (mg/kg) e taxa de recuperação (%).

De acordo com a análise realizada à figura 5.22, consegue-se afirmar que apenas 3 tipos de frutas apresentaram teores de nitratos na sua composição intrínseca. Dois desses tipos de frutas (Figo Seco e Salada de Fruta), com quatro amostras cada, uma correspondente a cada estação do ano, das quais se obteve a figura 5.23. O outro tipo de fruta que obteve um teor de nitratos quantificável foi a amostra do Morango, apenas com uma amostra, com o valor de 114 mg/kg.

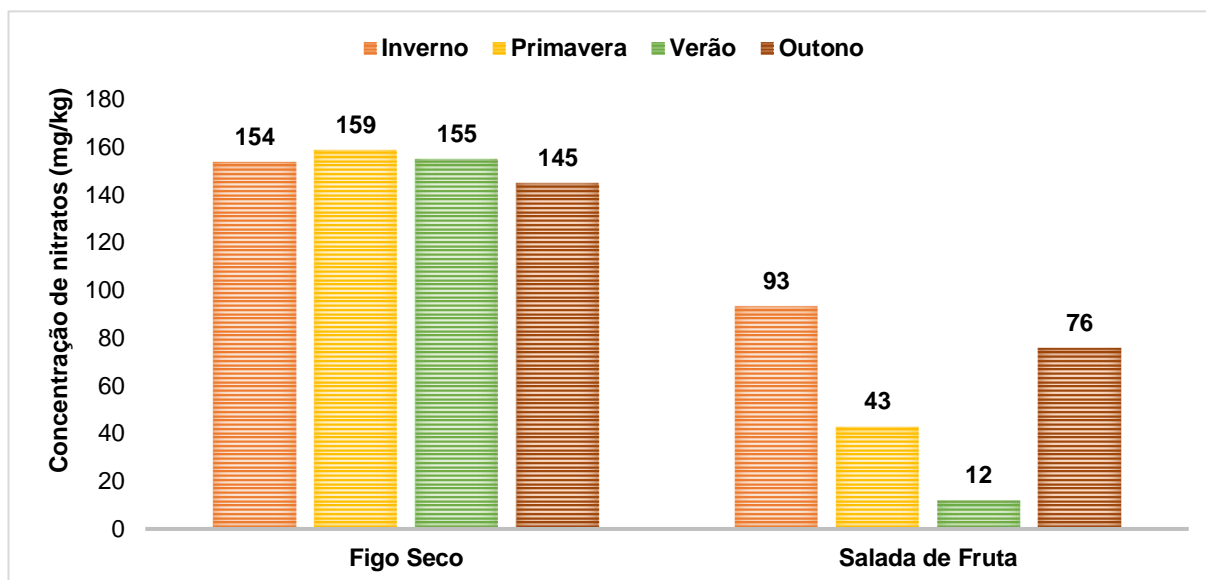


Figura 5.23 – Gráfico representativo dos teores de nitrato nos frutos, nas diferentes estações do ano, das amostras do grupo 9.

Todas as amostras quantificáveis do grupo 9 foram validadas pelo método analítico dos nitratos, acredito no INSA. Todas estas amostras (Figo Seco, Salada de Fruta e Morango) foram efetuadas com 3 tomas, com teor de nitratos dentro do limite de quantificação, com uma taxa de recuperação válida (60-120%) e com repetibilidade com um coeficiente de variação inferior a 10%.

Relativamente à figura 5.23, conseguimos observar uma maior variação na Salada de Fruta do que no Figo Seco. Esta variação pode-se dever a duas grandes causas, à grande quantidade de fruta que hoje em dia é produzida fora da sua época, sendo necessário o seu crescimento em estufas, e à baixa quantidade de luz solar que existe no Inverno e no Outono, comparado com a quantidade que existe no Verão e na Primavera. A altura do ano influencia a quantidade de nitratos nos alimentos produzidos na agricultura, porque uma menor intensidade luminosa, origina uma diminuição da ação fotossintética (ação indispensável para o desenvolvimento da planta e para o gasto dos nitratos), e consequentemente um aumento da concentração de nitratos nas plantas. Já em relação ao cultivo em estufas, os limites máximos do teor de nitratos de certos alimentos são superiores para quando são cultivados em estufas e em alturas com menos intensidade solar (Comissão Europeia, 2006; União Europeia, 2011).

Por outro lado, em relação aos figos secos, são produzidos numa determinada época do ano, mas são conservados de forma a serem consumidos durante o ano todo, pelo que o teor de nitratos não varia muito.

Os resultados obtidos da determinação do teor médio de nitratos das amostras do grupo 11, correspondente, ao grupo dos Cereais e produtos à base de cereais estão apresentados na figura 5.24.

Grupo 11				
TDS	Amostra	Nº de tomas	Resultado Final	Taxa de
Amostra			(mg/kg)	Recuperação (%) ¹
86	Arroz	3	<LOQ	(98)
87	Broa de milho	3	<LOD	-
88	Pão	3	<LOQ	(94)
89	Bolachas de água e sal	3	28	104
90	Massa	3	<LOD	-
91	Biscoitos e bolachas	3	<LOQ	(92)
92	Bolachas de chocolate	3	<LOD	-
93	Bolos de bolacha, caramelo, cenoura, mel, amêndoas, canela	3	<LOQ	(88)
94	Pão de ló	3	<LOQ	(86)
95	Bolos de chocolate	3	<LOQ	(100)
96	Bolos de laranja, maçã, inglês, ananás, coco, noz	3	16	93
97	Bolo, Queques	3	67	101
98	Bolos lêvedos	3	<LOD	-
99	Pão de leite	3	<LOD	-
100	Croissants	3	18	84
101	Tartes de leite condensado, natas, leite condensado e chocolate	3	60	98
102	Bolo, Pastel de nata	3	51	109
103	Tartes de fruta, frutos secos	3	<LOD	-
104	Bolo, Bolo de arroz	3	<LOD	-
105	Cereais e cereais de chocolate	3	<LOQ	(113)
106	Pipocas doces e salgadas	3	<LOD	-

¹ Nota: Critério de aceitação se N<500 mg/kg (TR de 60-120%) e N>500 mg/kg (TR de 90-110%).

Figura 5.24 – Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 11, respetivo número de tomas, resultado final (mg/kg) e taxa de recuperação (%).

Analisando a figura 5.25, observa-se que foram analisadas 21 amostras do grupo 11, das quais todas foram efetuadas com três tomas. Contudo, apenas 6 amostras foram quantificadas (gráfico 5.7), com uma repetibilidade com um coeficiente de variação inferior a 10%, com uma taxa de recuperação válida, dentro do limite de quantificação, embora com teores de nitratos relativamente baixos (16-67 mg/kg). Houveram 8 amostras que apresentavam valores abaixo do limite de deteção, não estando sequer na gama de trabalho deste método analítico. Por outro lado, as restantes 7 amostras, apresentaram valores inferiores ao limite de quantificação (10mg/kg) com uma taxa de recuperação válida. Este resultado mostra que na realidade o método foi validado com um limite de quantificação inferior a 10 mg/kg (3 mg/kg) como referenciado no ponto 5.1., daí a obtenção de taxas de recuperação dentro dos critérios de aceitação. No entanto, para fins práticos optou-se pelo primeiro ponta da curva de calibração para o valor do limite de quantificação. Esta opção deve-se ao facto de que os valores inferiores a 10 mg/kg não contribuem quase para a exposição, não sendo necessário um esforço acrescido para os quantificar.

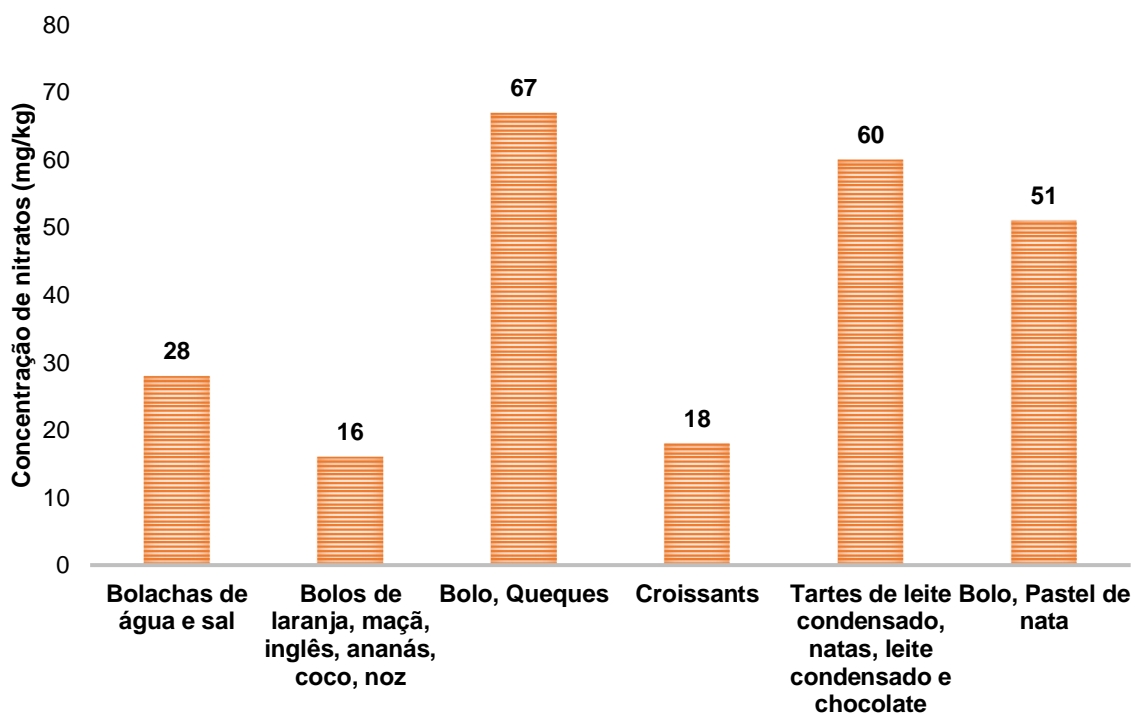


Figura 5.25 – Gráfico representativo dos teores de nitrato nas amostras quantificáveis do grupo 11.

Os resultados obtidos da determinação do teor médio de nitratos das amostras do grupo 13, correspondente, ao grupo dos Carne e produtos cárneos, estão apresentados na figura 5.26.

Grupo 13			
TDS Amostra	Amostra	Nº de tomas	Resultado Final (mg/kg)
115	Vaca, espetada, bife, picanha	1	10
116	Vitela, bife, costeleta	1	<LOQ
117	Porco, costeleta, perna, lombo, bife, entrecosto	1	<LOQ
118	Borrego	1	23
119	Coelho	1	11
120	Frango	1	<LOQ
121	Perú	1	<LOD
122	Presunto e bacon	1	63
123	Fiambre	1	41
124	Chouriço, alheira, paio, chourição	1	41
125	Salsicha	1	<LOQ

Figura 5.26- Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 13, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).

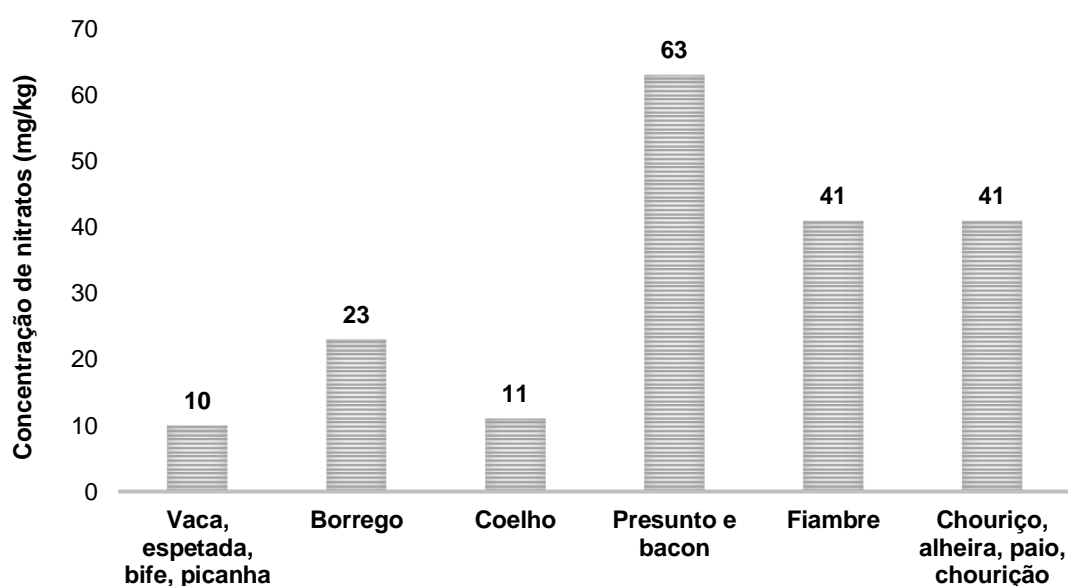


Figura 5.27 – Gráfico representativo dos teores de nitrato nas amostras quantificáveis do grupo 13.

Relativamente ao grupo 13, todas as amostradas analisadas, foram feitas através de uma única toma. Através da análise da figura 5.26, consegue-se verificar que apenas uma amostra ficou abaixo do limite de deteção, e quatro ficaram abaixo do limite de quantificação. Contudo, seis amostras foram quantificáveis, o que mostra que deverão ser novamente analisadas, mas com três tomas, de forma a ficarem validadas pelo método analítico dos nitratos. Na figura 5.27 estão as seis amostras quantificáveis, mostrando um baixo de teor de nitratos. Contudo, as amostras que mostram uma maior quantidade, são especificamente as amostras de carnes fumadas (Presunto, bacon; Fiambre; Chouriço, alheira, paio, chourição), o que mostra, que neste caso muito provavelmente estes teores são

provenientes dos conservantes (sais de nitrato) adicionados, na sua produção (Ministério Público, 2008).

Os resultados obtidos da determinação do teor médio de nitratos das amostras do grupo 16, correspondente, ao grupo dos Temperos, molhos e condimentos, estão apresentados na figura 5.28.

Grupo 16			
TDS Amostra	Amostra	Nº de tomas	Resultado Final (mg/kg)
134	Caldo de galinha, caldo de carne de vaca	1	<LOQ
135	Vinagre	1	28
136	Ketchup	1	10
137	Maionese	1	13
138	Molho cocktail, cubano, de alho, barbecue, inglês, de pimenta	1	19

Figura 5.28 - Resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 16, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).

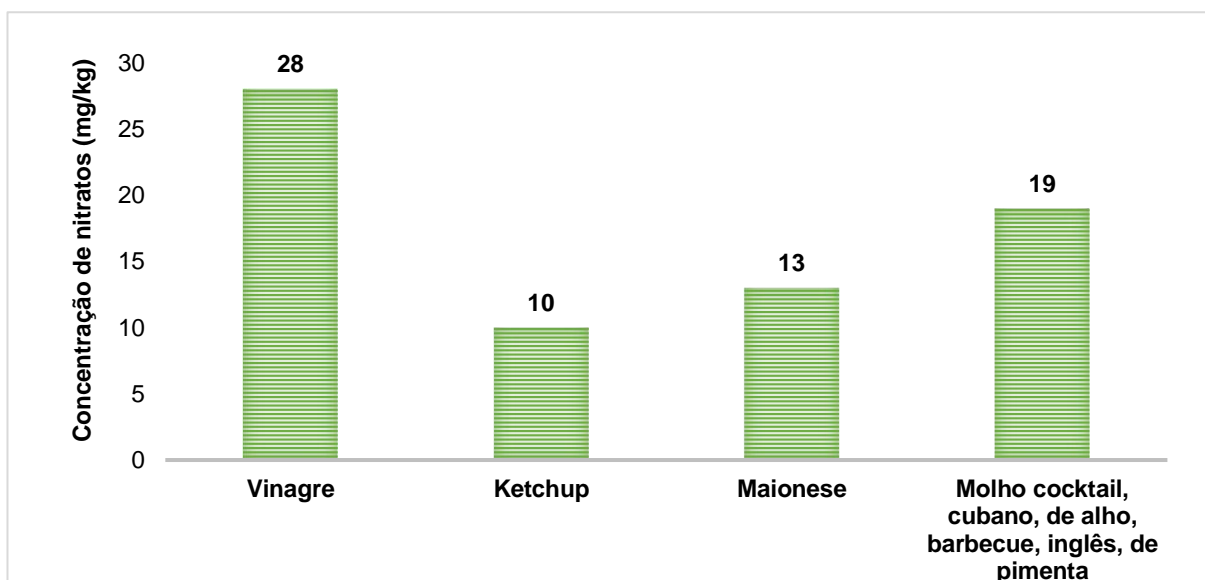


Figura 5.29 – Gráfico representativo dos teores de nitrato nas amostras quantificáveis do grupo 16.

Em relação ao grupo 16, consegue-se verificar que entre as cinco amostras analisadas, apenas uma se encontra abaixo do limite de quantificação, contudo nenhuma delas foi validada porque foram executadas com apenas uma toma. Embora as restantes quatro amostras tenham sido quantificáveis (figura 5.29), os teores de nitratos detetados foram baixos, o que de certa forma não vai influenciar negativamente na saúde.

Os resultados obtidos da determinação do teor médio de nitratos das amostras do grupo 18 e do grupo 20, correspondentes, aos grupos dos Açúcar, confeitaria e sobremesas doces à base de água e Água e outras bebidas à base de água, respetivamente, estão apresentados nas figuras 5.30 e 5.31.

Grupo 18			
TDS Amostra	Amostra	Nº de tomas	Resultado Final (mg/kg)
140	Açúcar	1	<LOQ
141	Sobremesas de chocolate	1	29
142	Gelatina	1	<LOD

Figura 5.30 - Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 18, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).

Grupo 20			
TDS Amostra	Amostra	Nº de tomas	Resultado Final (mg/kg)
163	Água Mineral Natural	1	<LOD
163.2	Água Mineral Natural	1	<LOD
163.3	Água Mineral Natural	1	<LOD
163.4	Água Mineral Natural	1	<LOD
164	Ice tea de limão, de manga, de pêssego	1	<LOD
165	Refrigerante de laranja, sem gás de laranja	1	<LOQ
166	Refrigerantes de cola	1	21

Figura 5.31 – Tabela com os resultados obtidos na determinação do teor médio de nitrato (mg/kg) existente em cada amostra do grupo 20, respetivo número de tomas e resultado final (mg/kg).

Dentro destes dois grupos analisados, o 18 (3 amostras) e 20 (7 amostras), apenas uma de cada grupo foi quantificável, mas com apenas ± 20 -30 mg/kg. Nas restantes amostras, uma de cada grupo, não teve uma concentração de nitratos suficiente para atingir o limite de quantificação, e as restantes não chegaram sequer a ser detetadas na gama de trabalho. Verificou-se, que nas águas minerais não se detetaram níveis de nitratos, por outro lado, dentro das bebidas à base de água, os refrigerantes de cola foram os únicos a conter níveis de nitratos quantificáveis, o que poderá ter origem nos extratos vegetais que fazem parte da sua constituição.

5.5. Discussão Bibliográfica

De acordo com o trabalho realizado, verificou-se a estabilidade da curva num período mínimo de 7 dias, a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, através de um estudo de distribuição *t-student* e comprovou-se que o injetor apresentava repetibilidade na injeção e linearidade, permitindo o seu uso no intervalo de 10 a 200 μL . A incerteza calculada do método foi de 17%.

Nos estudos de repetibilidade e precisão intermédia, o método analítico foi validado para os respetivos grupos analisados (“Pratos Compostos”, “Água e outras bebidas à base de água” e “Raízes ou tubérculos amiláceos e produtos derivados, plantas sacarinas”), com um coeficiente de variação inferior a 9%. Quanto à exatidão do método, foi comprovada com auxílio de uma avaliação de controlo de qualidade interno (FAPAS – puré de couve), verificando-se através do valor do z-score obtido ($-2 > \text{z-score} < 2$) (Fapas, 2018).

De entre os resultados obtidos, destacou-se o da amostra de “Salada de alface e tomate”, com um teor de nitratos de 911 mg/kg. Este valor deve-se principalmente à presença de alface nesta amostra, um hortícola folhoso que apresenta teores de nitratos elevados durante o ano todo, estando comprovado em estudos já realizados (Anexo VIII).

Estudos realizados por James et al. (2008) mostraram que o teor de nitratos no fiambre e no bacon foi de 19 mg/kg, e 23,3 mg/kg, respetivamente, e, de acordo com Bahadoran et al. (2016), o fiambre apresentou uma concentração de 19 mg/kg. Comparando com os resultados obtidos neste trabalho, o fiambre apresentou um teor de nitratos de 41 mg/kg, sendo este superior ao referida nos restantes estudos. Já em relação ao bacon, também se obteve uma concentração superior neste trabalho, de 63 mg/kg, mas a amostra contém também presunto, ou seja, a diferença de concentrações poderá ser devido a essa diferença (Bahadoran et al., 2016; Hsu et al., 2009).

Em relação à amostra de salsicha, neste trabalho determinou-se uma concentração de nitratos de 21 mg/kg, o que por sua vez, é muito idêntica à obtida no estudo em 2016, feito por Bahadoran et al. (2016), que obteve o valor de 19 mg/kg. Por outro lado, no estudo feito por, James et al. (2008) obteve-se valores de 54,9 mg/kg para a concentração de salsichas Frankfurt, esta discrepância de valores ser causada pelo tipo de salsichas analisadas (Bahadoran et al., 2016; Hsu et al., 2009).

Ainda no estudo de Bahadoran et al. (2016), determinou uma concentração muito baixa de nitratos no leite gordo e magro (1 mg/kg) e no queijo (3 mg/kg) analisado. Apesar dos valores obtidos neste estudo para ambos os alimentos, leite gordo e magro (apenas uma amostra) e queijo apresentarem valores abaixo do limite de deteção (< 3 mg/kg), estes estão de acordo com o estudo Bahadoran et al. (2016).

Em relação à batata, foram observados valores muito diferentes nos diferentes estudos. A EFSA revela concentrações de 106 mg/kg, e o estudo feito por Bahadoran et al. (2016), concentrações de 38 mg/kg. Neste trabalho, analisou-se batata cozida, e obteve-se um valor de 64 mg/kg. As diferenças dos valores podem ser causadas devido ao “estado da batata”, sendo que a amostra analisada neste trabalho era “batata cozida” (Bahadoran et al., 2016; EFSA, 2008).

As diferenças observadas nos diferentes estudos, não são significativas, uma vez que, todos os teores de nitratos estão na mesma ordem de grandeza, o que torna aceitável a sua comparação.

Conclusão

Com o intuito de se estudar a exposição da população aos nitratos através do consumo de alimentos, procedemos à análise de matrizes alimentares obtidas através de um estudo TDS

De forma a se garantir que os resultados obtidos são fidedignos, foi utilizado um método já validado e acreditado no INSA. Foram, no entanto, realizados mais alguns ensaios de validação para mostrar que o método analítico usado é preciso para mais três matrizes alimentares diferentes: os “Pratos Compostos”, “Água e outras bebidas à base de água” e “Raízes ou tubérculos amiláceos e produtos derivados, plantas sacarinas”. O coeficiente de variação obtido foi aceitável, uma vez que, foi inferior a 9%. Conseguiu-se também provar que o método é exato, através de um controlo de qualidade interno, isto é, tendo como base uma análise com valores facultados de forma certificada, como base de comparação.

De modo a facilitar o trabalho, procedeu-se ao estudo da estabilidade da curva de calibração, para não se ter que realizar a curva todos os dias. Determinou-se que a curva mantinha a sua estabilidade, no período mínimo de 7 dias, a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, através de um teste estatístico de distribuição *t*-Student.

Já no estudo das amostras do TDS, todos os resultados obtidos não contribuem de forma significativa para a exposição da população a nitratos, visto que a maioria dos resultados foram inferiores aos limites de quantificação e deteção e os restantes numa mesma ordem de grandeza (entre 10 e 160 mg/kg).

Apenas a amostra da “salada de alface e tomate”, mostrou resultados significativos (911 mg/kg). Este resultado deve-se à presença de alface que pertence ao grupo dos hortícolas folhosos. Dos alimentos analisados neste trabalho, este é o que contribui com maior percentagem para a exposição da população a nitratos.

Muitas das análises foram realizadas como forma de triagem porque já se suspeitava que não teriam nitratos na sua composição intrínseca, contudo, o estudo do TDS implica analisar todas as amostras para se obter a avaliação global.

Este estudo contribuiu com a análise de cerca de 50% das amostras do estudo TDS, para a avaliação da exposição, da população portuguesa, a nitratos.

Referências Bibliográficas

- ACF. (2016). Controlo de Qualidade Interno (DAN URQ - IT221_04 L). *Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*, pp 1–13.
- Arrobas, M. (2010). Fertilização. *Manual de Boas Práticas Em Espaços Verdes*, 87–91.
- ASAE. (2005). *Clostridium botulinium*. [Online] [13 de Março de 2019] <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/clostridium-botulinium.aspx>.
- ASAE. (2007). Formação de Compostos N-nitrosos. [Online] [17 de Março de 2019] <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/nitratos/formacao-de-compostos-n-nitrosos.aspx>.
- ASAE. (2017). Nitratos. [Online] [27 de Fevereiro de 2019] <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/nitratos.aspx>.
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Jeddi, S., Azizi, F., Ghasemi, A., & Hadaegh, F. (2016). Nitrate and nitrite content of vegetables, fruits, grains, legumes, dairy products, meats and processed meats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 51, pp 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.06.006>.
- Ball, G. F. M. (1988). Fat-soluble vitamin assays in food analysis - A comprehensive Review. Elsevier Applied Science Lt d., 326 pp.
- Bernhard, A. (2010). The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. [Online] [10 de Março de 2019] <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-15644632>.
- Canadian Council of Ministers of the Environment. (2012). Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life - Nitrate Ion. *Canadian Environmental Quality Guidelines*, (3), pp 146.
- Cemek, M., Akkaya, L., Birdane, Y. O., Seyrek, K., Bulut, S., & Konuk, M. (2007). Nitrate and nitrite levels in fruity and natural mineral waters marketed in western Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), pp 236–240. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.12.003>.
- Chung, J. C., Chou, S. S., & Hwang, D. F. (2004). Changes in nitrate and nitrite content of four vegetables during storage at refrigerated and ambient temperatures. *Food Additives and Contaminants*, 21(4), pp 317–322. <https://doi.org/10.1080/02652030410001668763>.
- Claessens, H. A., & Van Straten, M. A. (2004). Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1060(1–2), pp 23–41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.098>.
- Comissão Europeia. (2006). Regulamento (CE) N° 1881/2006 Da Comissão de 19 de Dezembro de 2006, 1–65.

Costa, J. C. D. (2015). "Validação de um Método de Cromatografia de Alta Eficiência para Determinação de Conservantes em Géneros Alimentícios". Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica, pp 1-127, ISEL.

EFSA. (2017). Nitrites and nitrates added to food, (June), pp 3–6. <https://doi.org/10.2805/485488>.

EFSA, WHO & FAO. (2011). Technical Report of EFSA , FAO and WHO: State of the art on Total Diet Studies based on the replies to the EFSA / FAO / WHO questionnaire on national total diet study approaches 1 World Health Organisation (WHO), Geneva , Switzerland, 206, pp 1–38.

EFSA, WHO & FAO. (2011) Towards a harmonised Total Diet Study approach: a guidance document. EFSA Journal, 9(11), pp 2450. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2450>.

European Commission. (1995). Reports of The Scientific Committee for Food (thirty-eighth series).

European Food Safety Authority (2008). Nitrate in vegetables - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. EFSA Journal, 689(April), pp 1–79. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.689>.

European Food Safety Authority. (2016). Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. EFSA Journal, 8(12), pp 1–42. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1935>.

Fapas. (2018). Nitrate in Cabbage Purée. *Food Chemistry*, (July).

Gabinetes dos Secretários de Estado do Ambiente e das Florestas e do Desenvolvimento Rural. (2018). Despacho nº 1230/2018. Diário da República.

Govari, M. & Pexara, A. (2018). Nitrates and Nitrites in meat products. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 66, pp 127–140.

Green, J. M. (1995). A Practical Guide to Analytical Method Validation. American Chemical Society, pp 305–309.

Guia ISO/IEC. (2008). Vocabulário Internacional de Metrologia. *Instituto Português Da Qualidade*.

González, A.G. & Herrador, M.A. (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TRAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(3), pp 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>.

Hester, R. D. (1996). "Fertilizers and nitrate leaching", *Agricultural Chemicals and the Environment*. Cambridge, United Kingdom: Royal Society of Chemistry, pp 1–26. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1039/9781847550088>.

Hord, N. G., Tang, Y., & Bryan, N. S. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefit. *The American Journal of Clinical Nutrition*, (6), pp 1–10. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27131>.

Hsu, J., Arcot, J., & Alice Lee, N. (2009). Nitrate and nitrite quantification from cured meat and vegetables and their estimated dietary intake in Australians. *Food Chemistry*, 115(1), pp 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.081>.

Huarte-Mendicoa, J. C., Astiasarán, I., & Bello, J. (1997). Nitrate and nitrite levels in fresh and frozen broccoli. Effect of freezing and cooking. *Food Chemistry*, 58(1–2), pp 39–42. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00193-8).

IARC. (2010). Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. World Health Organization International Agency For Research on Cancer, 94.

IARC. (2018). Ingested Nitrate and Nitrite. [Online] [12 de Fevereiro de 2019] <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono94-6.pdf>.

ICH. (1995). Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology. International Conference on Harmonisation, pp 1–13. https://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf

Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial. (2007). Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. InMetro.

ISO. (1990). ISO 8466-1:1990(en) Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. [Online] [10 de Janeiro de 2019] <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:8466:-1:ed-1:v1:en>.

ISO. (1994). ISO 5725-1:1994(en) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. [Online] [4 de Fevereiro de 2019] <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:5725:-1:ed-1:v1:en>.

Johnson, C., Albrecht, G., Ketterings, Q., Beckman, J., & Stockin, K. (2005). Nitrogen Basics – The Nitrogen Cycle. Cornell University - Department of Crop and Soil Sciences, 2. <https://doi.org/10.1063/1.1412610>.

Jornal Oficial da União Europeia. (2011). Regulamento (UE) N°1129/2011. Jornal Oficial Da União Europeia, (6), 25.

Kanaan, S. S., & Economakis, C. D. (1992). Effect of climatic conditions and time of harvest on growth and tissue nitrate content of lettuce in nutrient film culture. *Acta Horticulturae*, 323, pp 75-80. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1993.323.5>.

Katan, M. B. (2009). Nitrate in foods: Harmful or healthy? *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(1), pp 11–12. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28014>.

Kretchmer, N. (1994). Nutrition is the keystone of prevention. *American Society for Clinical Nutrition*, USA: 60(1) 1.

Laia, R., Serra, C., & Vasco, E. (2017). Validation of a High Performance Liquid Chromatography Method for the determination of nitrates in vegetables. *Euroanalysis*, Estocolmo, Suécia.

Larsoon, K.A., Darnerud, P.O., Ilback, N-G. & Merino, L. (2011). "Estimated Dietary Intake of Nitrite and Nitrate in Swedish Children", *Food Aditives & Contaminants*, 2011, pp 1-26.

Leszczynska, T., Filipiak-Florkiewicz, A., Ciéslik, E., & Sikora, E. (2009). Effects of some processing methods on nitrate and nitrite changes in cruciferous vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.025>.

Lundberg, J. O., Weitzberg, E., Cole, J. A., & Benjamin, N. (2004). Nitrate, bacteria and human health. *Nature Reviews Microbiology*, 2(7), pp 593–602. <https://doi.org/10.1038/nrmicro929>.

Malviya, R., Bansal, V., Pal, O.P. & Sharma, P.K. (2010). High Performance Liquid Chromatography: A Short Review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2, pp 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0969-6997\(11\)00073-1](https://doi.org/10.1016/S0969-6997(11)00073-1).

Martins, A. F. S. (2016). "Implementação e validação de métodos analíticos". Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química, pp 1-126, FCTUC.

McKnight, G. M., Duncan, C. W., Leifert, C., & Golden, M. H. (2009). Dietary nitrate in man: friend or foe? *British Journal of Nutrition*, 81(05), pp 348-358. <https://doi.org/10.1017/s000711459900063x>.

Militão, C. (2004). "Estudo do ciclo do azoto - uma aplicação para o ensino". Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biologia, pp 1-104, FCUP.

Ministério do Ambiente. (1997). Decreto Lei 235/97. *Diário Da República*, pp 4640–4644.

Ministério do Ambiente. (1999). Decreto Lei nº68/99. *Diário Da República*, pp 1372–1373.

Ministério do Ambiente. (2017). Decreto-Lei nº152/2017. *Diário Da República*, (Ambiente), pp 6555–6576.

Ministério Público. (2008). Decreto-Lei n.º 33/2008 de 25 de Fevereiro de 2008. *Diário Da República*, 1ª Série(1), pp 1215–1221.

Ministérios das Finanças e da Administração Pública e da Economia e da Inovação. (2009). Portaria nº 821/2007 de 31 de Julho. *Diário Da República: I Série*, pp 878–881. Retrieved from <https://dre.pt/pesquisa/-/search/601363/details/maximized>.

Miyazawa, M., Khatounian, C. A., & Penha, L. A. . (2001). Teor de nitrato nas folhas de alface produzida em cultivo convencional, orgânico e hidropônico. *Agroecologia*, pp 23. http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/OrgConvenc.pdf.

Mocak, J; Bond, A.M.; Mitchell, S. & Scollary, G. (1997). A statistical overview of standard (IUPAC AND ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification application to voltammetric and stripping techniques. *Pure & Applied Chemistry*, 69, pp 297–328.

Monteiro, A. P. (2014). "Ocorrência de derivados azotados em alguns produtos destinados à alimentação infantil: nitratos e nitritos". Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, pp 1-187, FFUL.

Mozolewski, W., & Smoczynski, S. (2009). Effect of culinary processes on the content of nitrates and nitrites in potatoe. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(6), pp 357–361. <https://doi.org/10.3923/pjn.2004.357.361>.

Nascimento, T. S., Pereira, R. O. L., Mello, H. L. D., & Costa, J. (2008). Metemoglobinemia: do diagnóstico ao tratamento. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 58(6), pp 651–664. <https://doi.org/10.1590/s0034-70942008000600011>.

Nollet, L. M. L. (2000). *Food Analysis by HPLC*. 2ª Edition, Marcel Dekker Inc. Nova York (Basel), 1049 pp.

Prasad, S., & Chetty, A. A. (2008). Nitrate-N determination in leafy vegetables: Study of the effects of cooking and freezing. *Food Chemistry*, 106(2), pp 772–780. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.005>.

Powelson, D.S., Addiscott, T.M., Benjamin, N., Cassman, K.G., Kok, T.M., Grinsven, H.V., L'hirondel, J-I., Avery, A.A. & Kessel, C.v. (2008). When does nitrate become a risk for humans? *Journal of Environment Quality*, 37, 291-295. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0177>.

PubChem. (2004). Nitrate. [Online] [15 de Fevereiro de 2019] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nitrate#section=Pharmacology-and-Biochemistry>.

RELACRE. (2000). Validação de Métodos internos de ensaios em análises química. Guia RELACRE 13. [Online] [11 de Fevereiro de 2019] <http://www.relacre.pt/assets/relacreassets/files/commissionsandpublications/GuiaRELACRE13.pdf>

RELACRE. (2018). Quantificação de Incerteza de Medição em Ensaio Químicos.

Ribani, M., Bottoli, C., Collins, C. H., Jardim, I., & Melo, L. (2004). Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5), 771–780. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>.

Rytel, E., Gołubowska, G., Lisińska, G., Pęksa, A., & Aniołowski, K. (2005). Changes in glycoalkaloid and nitrate contents in potatoes during French fries processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(5), pp 879–882. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2048>

Santamaria, P. (2006). Nitrate in vegetables: Toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), pp 10–17. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2351>.

Sargaço, B. R. (2013). "Otimização e validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a determinação do edulcorante ciclamato. Ocorrência em adoçantes de mesa". Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica, pp 1-113, ISEL.

Schuster, B. E. ., & Lee, K. (1987). Nitrate and nitrite methods of analysis and levels in raw carrots, processed carrots and in selected vegetables and grain products. *Journal of Food Science*, 52(6), pp 1632–1636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb05893.x>.

Shao-Ting, D., Yong Song, Z., & Xian Yong, L. (2007). Accumulation of nitrate in vegetables and its possible implications to human health. *Agricultural Sciences in China*, 6(10), pp 1246–1255. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(07\)60169-2](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(07)60169-2).

Silva, M. (2010). "Avaliação da influência da adubação azotada nítrica e amoniacal no crescimento e na actividade de algumas enzimas em oliveiras jovens (*Olea europaea L. cv Cobrançosa*)". Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agrónoma, pp 1-62, Instituto Superior de Agronomia.

Silva, M. (2014). "Contributo para a determinação simultânea, por cromatografia líquida de alta resolução, de carotenoides, vitamina A e vitamina E em amostras compostas por diferentes matrizes alimentares". Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica, pp 1-169, ISEL.

Silvestre, M.M. & Lidon, F. J. (2007). *Indústrias Alimentares Aditivos e Tecnologia*. (E. Editora, Ed.) Lisboa.

Skoog, S.R.; Holler, D.A.; Crouch, F. J. (2007). *Principles of Instrumental Analysis*, 6, (Cengage Learning) USA.

Snyder, L. R., & Dolan, J. W. (1979). *Introduction to modern liquid chromatography*. Introduction to Modern Chromatography. A Wiley-Interscience Publication.

The International Pharmacopoeia. (2017). *High-Performance liquid chromatography*, pp 1–9.

The Linde Group. (2019). *High performance liquid chromatography (HPLC)*. [Online] [2 de Fevereiro de 2019] http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/high_performance_liquid_chromatography.html.

Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure Applied Chemistry*, 74(5), pp 835–855. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>.

U.S Environmental Protection Agency. (2007). *Nitrates and Nitrites: TEACH Chemical Summary, Toxicity and Exposure Assessment for Children's Health*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

União Europeia. (2006). Regulamento (CE) N° 1882/2006 Da Comissão de 19 de Dezembro de 2006. *Jornal Oficial Da União Europeia*, pp 25–31.

União Europeia. (2008). Regulamento (CE) N° 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008. *Jornal Oficial Da União Europeia*.

União Europeia. (2011). Regulamento (UE) N° 1258/2011 Da Comissão de 2 de Dezembro de 2011. Jornal Oficial Da União Europeia. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1935>.

União Europeia. (2018a). Decisão de Execução (UE) 2018/1928 Da Comissão de 6 de dezembro de 2018. Jornal Oficial Da União Europeia.

União Europeia. (2018b). Decisão de Execução (UE) 2018/820 da Comissão de 31 de maio de 2018. Jornal Oficial Da União Europeia.

Vasco, E. R., & Alvito, P. C. (2011). Occurrence and infant exposure assessment of nitrates in baby foods marketed in the region of lisbon, Portugal. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 4(3), pp 218–225. <https://doi.org/10.1080/19393210.2011.611951>.

Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M. B., Seabra, M. J., ... Nunes, S. (2009). Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal. *ASAE*, pp 1–330.

Viana, V. (2014). Psicologia, saúde e nutrição: Contributo para o estudo do comportamento alimentar. *Análise Psicológica*, 20(4), 611–624. <https://doi.org/10.14417/ap.24>.

Villalba, H. A. G., Otto, R., Trivelin, P. C. O., & Leite, J. M. (2014). Fertilizantes nitrogenados: novas tecnologias. *Informações Agronômicas*, 148, pp 12–20.

Volatier, J. (2016). Total Diet Study. *INSA*. <https://doi.org/10.1002/047126363x.agr588>.

Weightman, R.M., Dyer, C., Buxton, J. & Farrington, D. (2006). "Effects of light level, time of harvest and position within field on variability of tissue nitrate concentration in commercial crops of lettuce (*Lactuca sativa*) and endive (*Cichorium endiva*)". *Food Additive and Contaminants*, 23, pp 462-469.

World Health Organization, (1995). International Programme on Chemical Safety. [Online] [23 de Janeiro de 2019] http://www.who.int/ipcs/publications/training_poisons/basic_analytical_tox/en/index10.html.

World Health Organization, (2018). Nitrate. [Online] [11 de Março de 2019] <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=709>.

World Health Organization,(2015). European Food and Nutrition Action Plan, 1-4. [Online] [19 de Março de 2019], www.euro.who.int/_data/assets/pds_file/0003/294474/European-Food-Nutrition-Action-Plan-20152020-2n-pdf?ua=1.

Anexos

Anexo I - Tabela de grupos de alimentos, baseado no sistema de classificação FoodEx2.

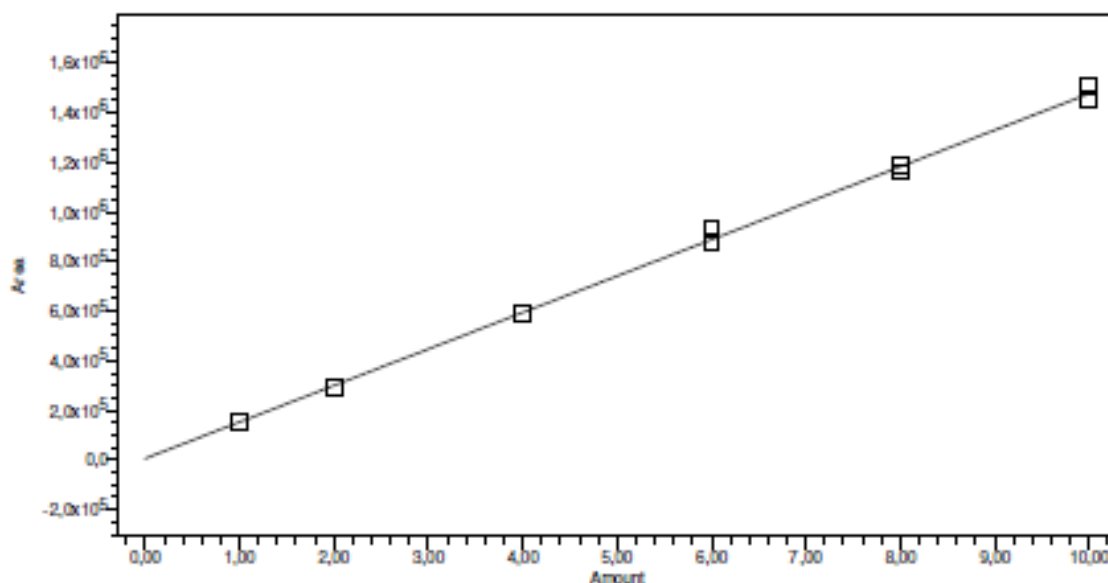
NÚMERO	GRUPOS FOODEX2
1	Aditivos, aromatizantes e auxiliares tecnológicos para panificação
2	Bebidas alcoólicas
3	Gorduras e óleos animais e vegetais
4	Café, cacau, chá e infusões
5	Pratos compostos
6	Ovos e ovoprodutos
7	Peixe, produtos da pesca, anfíbios, répteis e invertebrados
8	Produtos alimentares para população jovem
9	Fruta e produtos da fruta
10	Sumos e néctares de fruta e produtos hortícolas
11	Cereais e produtos à base de cereais
12	Leguminosas, frutos secos, sementes oleaginosas e especiarias
13	Carne e produtos cárneos
14	Leite e produtos lácteos
15	Produtos para dietas não padronizadas, substitutos e suplementos alimentares ou agentes fortificantes
16	Temperos, molhos e condimentos
17	Raízes ou tubérculos amiláceos e produtos derivados, plantas sacarinas
18	Açúcar, confeitaria e sobremesas doces à base de água
19	Produtos hortícolas e derivados
20	Água e outras bebidas à base de água

Anexo II – Documento do software Empower (LC Calibration Report) que mostra os resultados da Curva de Calibração (Resíduos - %, r e r²).



LC Calibration Report

Processing Method:	SS20180607N	System:	HPLC5
Processing Method ID:	88370	Channel:	W2996 210,0nm-1,2
Calibration ID:	89079	Proc. Chnl. Descr.:	W2996 PDA 210,0 nm at 1,2
Date Calibrated:	14-06-2018 10:50:32 Europe/Lisbon		



Peak Name: Nitratos; RT: 3,793; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 89080; R: 0,999229; R²: 0,998459; Weighting: None; Equation: $Y = 1,47e+005 X + 6,30e+003$; Standard Error 2,014469e+004

Peak: Nitratos

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1	89084	Nitratos		1,000	156996,001	1,025	-2,45	No	No
2	P1	89088	Nitratos		1,000	156644,502	1,023	-2,22	No	No
3	P2	89091	Nitratos		2,000	293773,500	1,956	2,28	No	No
4	P2	89094	Nitratos		2,000	294248,502	1,959	2,11	No	No
5	P3	89097	Nitratos		4,000	592601,500	3,988	0,29	No	No
6	P3	89100	Nitratos		4,000	590193,998	3,972	0,71	No	No
7	P4	89103	Nitratos		6,000	929679,507	6,281	-4,48	No	No
8	P4	89106	Nitratos		6,000	874737,505	5,907	1,57	No	No

Reported by User: Elsa Vasco (Evasco)
 Report Method: LC Calibration Report
 Report Method ID: 13270
 Page: 1 of 2

Project Name: Referencia/Nitratos
 Date Printed:
 14-06-2018
 10:54:24 Europe/Lisbon

Peak: Nitratos

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
9	P5	89112	Nitratos		8,000	1185644,486	8,022	-0,28	No	No
10	P5	89113	Nitratos		8,000	1159991,006	7,848	1,94	No	No
11	P6	89116	Nitratos		10,000	1505368,018	10,197	-1,93	No	No
12	P6	89120	Nitratos		10,000	1450150,004	9,822	1,82	No	No

Peak: Nitratos

	Residual Sum of Squares
1	4,058086e+009
2	4,058086e+009
3	4,058086e+009
4	4,058086e+009
5	4,058086e+009
6	4,058086e+009
7	4,058086e+009
8	4,058086e+009
9	4,058086e+009
10	4,058086e+009
11	4,058086e+009
12	4,058086e+009

Anexo III – Folha para cálculo da concentração de nitratos, em mg/kg, das amostras do estudo da repetibilidade.

PARÂMETRO:	Nitrato					
Nº/Data de Entrada:	139					
Amostra:	Batata Cozida					
Observações:	SS20190208N2					
Toma de Amostra	1	2	3	4	5	6
Data de análise:	06-02-2019					
Executante:	ACR					
Pasta Nº:	03/19					
Diluição na técnica	1					
Rectas de Calibração: Y(área) vs X($\mu\text{g/mL}$)						
Resíduos $\leq 10\%$	Sim					
Coefficiente correlação ($r \geq 0,995$)	Sim					
Toma da amostra (g)	10,3910	10,3664	10,1090	10,4335	10,5204	10,4716
Volume em que a amostra é diluída (mL)	200	200	200	200	200	200
Diluição posterior	1	1	1	1	1	1
Concentração Sol. Analisada ($\mu\text{g/mL}$)	3,4960	3,4930	3,3810	3,6400	3,5380	3,7190
Concentração da Toma de Amostra (mg/kg amostra)	67,2890	67,3908	66,8909	69,7752	67,2598	71,0302
Concentração Média da Amostra (mg/kg Amostra)	68,2727					
repetibilidade ($CV_r=5\%$)	OK					
r (repetibilidade)	13,6545					

Anexo IV - Folha para cálculo do desvio padrão relativo da repetibilidade (RSDr).

		Natureza da amostra	139		
DADOS DE PRECISÃO		Descrição da amostra	Batata Cozida - Nitratos		
		Método	Nitratos		
Preencher as células verdes		DADOS / série	SS20191206N2	SS20190207N2	SS20190208N2
		data de análise	06-02-2019	07-02-2019	08-02-2019
		série(i)	1	2	3
		n			
		1	72,3647	71,5984	67,2890
		2	70,2719	70,8912	67,3908
		3	69,0600	70,9179	66,8909
		4	67,0830	70,4708	69,7752
		5	68,2946	70,6167	67,2598
		6	67,4707	71,3273	71,0302
Nº ensaios por Operador	n		6	6	6
Média	\bar{x}		69,0908	70,9704	68,2727
Desvio Padrão	S		1,969989867	0,425582993	1,705420993
Variância	S^2		3,880860077	0,181120884	2,908460764
CV%	CV%		2,851304867	0,599662757	2,497956049
Desvio padrão da repetibilidade	S_{ri}	1,969989867			
Variância da repetibilidade	S_{ri}^2	3,880860077			
Limite de repetibilidade	r	5,515971628			

$$S_{ri}^2 = \text{Máx.}(S_i^2)$$

$$r = 2,8 \cdot \sqrt{S_{ri}^2}$$

Anexo V - Folha para cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (RSD_R).

		Natureza da amostra	139				
		Descrição da amostra	Batata Cozida - Nitratos				
DADOS DE PRECISÃO		Método	Nitratos				
		DADOS / série	SS20191206N2	SS20190207N2	SS20190208N2		
		data de análise	06-02-2019	07-02-2019	08-02-2019		
		série(i)	1	2	3		
		n	$y_{i,n}$	$(y - \bar{y})$	$y_{i,n}$	$(y - \bar{y})$	$y_{i,n}$
		1	72,36471516	2,920093242	71,59843807	2,153816148	67,2890001
		2	70,27188068	0,827258758	70,89117823	1,446556308	67,39080105
		3	69,05999514	-0,384626776	70,91791323	1,473291315	66,89088931
		4	67,08297947	-2,36164245	70,47077827	1,026156355	69,77524321
		5	68,29460417	-1,150017743	70,61668682	1,172064902	67,25980001
		6	67,4707357	-1,973886214	71,32734085	1,882718935	71,03021506
Nº de ensaios por operador	n		6	6	6		
Média dos ensaios de todos os operadores (N ensaios)	\bar{y}	69,44462192					
Numero total de determinações total	N	18					
	$\sum (y - \bar{y})^2$	57,81206072					
Desvio padrão da precisão intermédia	S_{P_i}	1,844101259					
Variância da precisão intermédia	$S_{P_i}^2$	3,400709454					
Limite de precisão intermédia	P_i	5,163483526					
CV%	CV%	2,655499027					

$$S_{P_i(T.O.)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^N (y_k - \bar{y})^2}$$

$$P_i = 2,8 \sqrt{S_{P_i}^2}$$

Anexo VI – Folha de Cálculo da concentração de Nitratos (mg/kg).

PARÂMETRO:	Nitratos					
Nº/Data de Entrada:	89					
Amostra:	Bolachas de água e sal					
Observações:	SS20190130N1			SS20190131N		
Toma de Amostra	1	2	3	4	5	6
Data de início análise:	30.01.2019			30.01.2019		
Executante:	ACR			ACR		
Pasta Nº:	3/19			3/19		
Diluição na técnica	1					
Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL)						
Resíduos ≤ 10 %	Sim			Sim		
Coefficiente correlação (r)≥0,995	Sim			Sim		
Toma da amostra (g)	5,0362	5,0110	5,0033	5,0362	5,0110	5,0033
Volume em que a amostra é diluída (mL)	200	200	200	200	200	200
Concentração do padrão (µg/mL)			1000			1000
Volume do padrão adicionado (mL)			1,5			1,5
Diluição posterior	1	1	1	2	2	1
Concentração Sol. Analisadas (µg/mL)	0,6690	0,5660	8,4200	1,4780	1,2930	8,4980
Concentração da Toma de Amostra (mg/kg amostra)	26,5677	22,5903	336,5779	29,3475	25,8032	339,6958
Concentração Média da Amostra (mg/kg Amostra)	24,5790			27,5754		
Repetibilidade (CV _r =5%)	Repetir			OK		
Taxa de recuperação (%)	104,1			104,1		
r (repetibilidade)	25,4202			25,8330		
Data fim de análise						

Anexo VII – Cromatogramas de amostras analisadas.

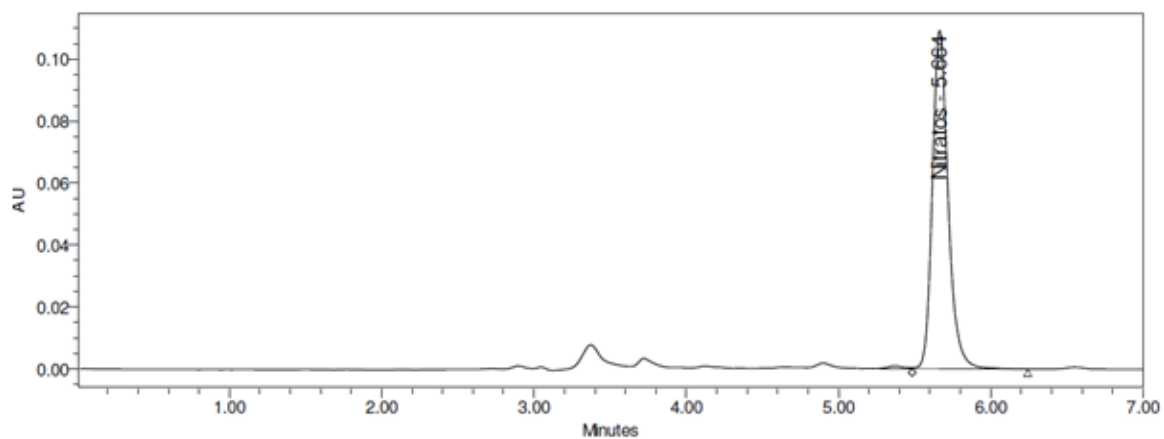


Figura III.I- Cromatograma da amostra da salada de alface com tomate, apresentada no tempo de retenção= 5,664min;

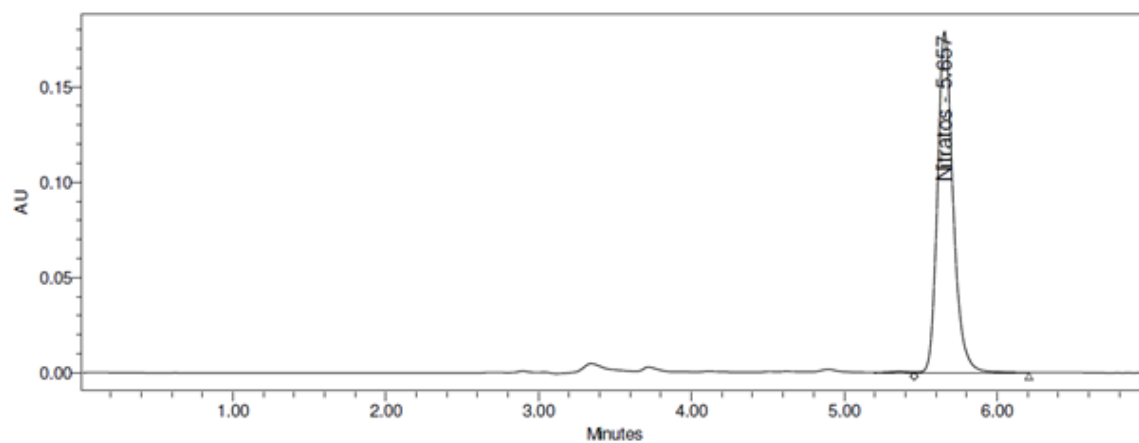


Figura III.II- Cromatograma da amostra da salada de alface com tomate com adição de padrão, apresentada no tempo de retenção= 5,657min;



Teor de nitrato em produtos hortícolas e frutos consumidos ao longo do ano em Portugal

Nitrate content in vegetables and fruits consumed throughout the year in Portugal

Rita Lais⁽¹⁾, Ana Rebelo^(2,3), Celeste Sara⁽¹⁾, Elsa Vasco⁽³⁾

elsa.vasco@insa.min-saude.pt

(1) Área Departamental de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa, Portugal

(2) Departamento de Ciências da Terra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Costa da Caparica, Portugal

(3) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Resumo

Os nitratos são comuns na natureza e amplamente encontrados em alimentos, água e solo, embora sejam os produtos hortícolas a sua principal fonte de ingestão. Os produtos hortícolas têm uma função nutricional essencial e desempenham um papel importante na proteção da saúde mas quando consumidos em excesso, os nitratos podem causar efeitos adversos. No sentido de poder avaliar a exposição alimentar da população a nitratos é importante determinar os teores de nitratos nos alimentos na forma como são consumidos e conhecer como os seus valores podem ser influenciados pela sazonalidade. Neste estudo, a quantificação do nitrato foi realizada através de um método HPLC-UV aplicado em 17 amostras diferentes de produtos hortícolas e frutos obtidas através do estudo piloto no âmbito do projeto Total Diet Study Exposure (TDS-Exposure). O teor de nitrato nas amostras variou entre 11 e 2360 mg/kg de produto. Na alface, produto hortícola que possui teores máximos legalizados, a concentração de nitrato em todas as amostras foi menor que os limites máximos permitidos (2500 a 4500 mg/kg). Relativamente ao efeito da sazonalidade, as variações encontradas em algumas das amostras não foram na sua maioria significativas.

Abstract

Nitrate compounds are common in nature and widely found in foods, waters and soils, although vegetables are considered the main source of dietary nitrate intake. Vegetables have an essential nutritional function and play an important role in health protection, but when consumed in excess, nitrates could cause adverse effects. In order to assess the dietary exposure of the population to nitrates, it is important to determine the levels of nitrates in food in the way they are consumed and to know how their values can be influenced by seasonality. In this study, nitrate quantification was performed using an HPLC-UV method applied to 17 different samples of vegetables and fruits obtained through the pilot study under the Total Diet Study Exposure project (TDS-Exposure). The nitrate content in the samples ranged between 11 and 2360 mg/kg of product. In the lettuce, vegetable that has maximum legislated contents, the concentration of nitrate in all the samples was smaller than the maximum permitted levels (2500 a 4500 mg/kg). Regarding the effect of seasonality, the variations found in some of the samples were not mostly significant.

Introdução

O nitrato ocorre naturalmente nas plantas onde é acumulado. O potencial para acumulação depende de vários fatores bióticos e abióticos e nas plantas, é nas folhas que se encontra a maior concentração em nitrato. As sementes, frutos e tubérculos apresentam, na sua maioria, teores mais reduzidos. Os nitratos são usados na agricultura como fertilizante e no processamento de alimentos como aditivo alimentar, nomeadamente, em carnes (1,2).

Embora os nitratos não sejam aparentemente tóxicos, os seus metabolitos e produtos de reação, como por exemplo, o nitrito, o óxido nítrico e as nitrosaminas tornam esta substância de importância regulatória devido às suas implicações potencialmente adversas na saúde, como a metahemoglobinemia e a carcinogénese (1,2). No entanto, alguns autores referem que a conversão de nitrato em nitrito desempenha um importante papel antimicrobiano no estômago (3) e que outros metabolitos do nitrato têm papéis fisiológicos/farmacológicos relevantes na saúde (4,5).

A exposição humana ao nitrato é principalmente exógena e resulta do consumo de produtos hortícolas e frutos (cerca de 60-80%) e, em menor escala, de água e de alimentos processados (1).

Deste modo, considerando os riscos associados à ingestão de nitrato, foi fixada uma dose diária admissível (DDA) de 3,7 mg/kg de peso corporal/dia (expressa em NO_3^-). O Regulamento (CE) nº 1831/2003, de 19 de dezembro, fixa também teores máximos para o nitrato em espinafres, em alface e em produtos à base de cereais bem como em alimentos para bebés, destinados a lactantes e crianças jovens. Como as con-