



## Validação do Método Analítico de Determinação de Nitrogênio Total para Atender a DOQ-CGRE-008 de 2010 do Inmetro

Sidinéia Cordeiro de Freitas<sup>1</sup>  
Carmine Conte<sup>2</sup>  
José Manoel de Oliveira<sup>3</sup>

### Introdução

Para atender à norma ABNT NBR ISO/IEC 17025– Requisitos Gerais de Competência dos Laboratórios de Ensaio e Calibração (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2011), o INMETRO publicou um documento (DOQ-CGRE-008 de 2011) de orientação sobre validação de métodos analíticos (INMETRO, 2011b). O protocolo preconizado no documento foi seguido para o ensaio de nitrogênio total, de acordo com a definição de cada área e subárea de atividade, empregando matrizes pertencentes a cada uma das subáreas, conforme descrito no Documento NIT-DICLA-016 (INMETRO, 2011a). Em Laboratórios de Análise de Alimentos há necessidade de se obter certificações para garantir que as características de desempenho de um método sejam entendidas e demonstradas, indicando que o mesmo é cientificamente sadio, sob as condições nas quais ele deve ser aplicado.

A aplicação deste guia demonstrou que a Determinação de Nitrogênio Total pelo método 2001.11 modificado, da AOAC International (2010), é capaz de atender às necessidades do problema analítico e também demonstrou que o método de determinação de nitrogênio total está validado para uma gama de matrizes.

### Resultados obtidos

#### Validação do branco

##### Dados do ensaio de repetitividade

Matriz – Mamão *in natura*  
(para todas as matrizes das subáreas)

Replicatas	Valor em g/100g
1	0,07
2	0,10
3	0,08
4	0,08
5	0,08
6	0,09
7	0,08
8	0,09

$$LD = \bar{X} + t_{(n-1,1-\alpha)} \cdot s$$
$$LQ = \bar{X} + 5s$$

LD – limite de detecção;  
LQ – limite de quantificação;  
 $\bar{X}$  – média; n – total de ensaios;  
s – desvio padrão;  
t – valor de Student;  
 $\alpha$  – grau de confiança.

<sup>1</sup>Engenheira Química, D.Sc. em Ciência de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, sidinea.freitas@embrapa.br.

<sup>2</sup>Engenheiro Químico, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, carmine.conte@embrapa.br.

<sup>3</sup>Assistente da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, josemanoel.oliveira@embrapa.br.

## Validação por subáreas de atividades

### Dados do ensaio de repetitividade

Alimentos de origem animal

Matriz: Patê de presunto

Replicatas	Valor em g/100g
1	1,20
2	1,22
3	1,23
4	1,20
5	1,19
6	1,25
7	1,23
8	1,23
9	1,16
10	1,23

Lácteos

Matriz: Leite em pó

Replicatas	Valor em g/100g
1	2,54
2	2,66
3	2,57
4	2,63
5	2,61
6	2,59
7	2,57
8	2,61
9	2,56
10	2,60

Alimentos de origem vegetal

Matriz: Farinha de soja

Replicatas	Valor em g/100g
1	6,72
2	6,76
3	6,67
4	6,72
5	6,63
6	6,66
7	6,66
8	6,63
9	6,61
10	6,65

Alimentos processados

Matriz: Biscoito

Replicatas	Valor em g/100g
1	1,07
2	1,02
3	1,06
4	1,07
5	1,04
6	1,03
7	1,07
8	1,06
9	1,04
10	1,08

Bebidas não alcoólicas

Matriz: Suco de maçã

Replicatas	Valor em g/100g
1	0,00
2	0,00
3	0,00
4	0,00
5	0,00
6	0,00
7	0,00
8	0,00
9	0,00
10	0,00

### Dados do ensaio de precisão intermediária

Alimentos de origem animal

Matriz: Patê de presunto

Replicatas	Valor em g/100g
1	1,18
2	1,33
3	1,25

Lácteos

Matriz: Leite em pó

Replicatas	Valor em g/100g
1	2,63
2	2,66
3	2,62

**Lácteos**

Matriz: Leite em pó

Replicatas	Valor em g/100g
1	2,63
2	2,66

**Alimentos processados**

Matriz: Biscoito

Replicatas	Valor em g/100g
1	1,05
2	1,09
3	1,07

**Alimentos de origem vegetal**

Matriz: Farinha de soja

Replicatas	Valor em g/100g
1	6,47
2	6,67
3	6,74

**Bebidas não alcoólicas**

Matriz: Suco de maçã

Replicatas	Valor em g/100g
1	0,00
2	0,00
3	0,00

**Dados do ensaio de recuperação**

Matriz: Farinha de trigo fortificada com EDTA (sal dissódico do ácido etileno diamino tetra-acético)

Padrão: EDTA - 9,57% Nitrogênio; Marca: Leco; Lote: 1042; Peso Molecular: 292,24g/mol

R	Massa Farinha	Massa EDTA adicionada	Massa Total	Contribuição de N do EDTA (g)	N total experimental na matriz fortificada (%)	N total Teórico na matriz fortificada (%)
1	0,5259	0,0000	0,5259	0,0000	1,80	1,8100
2	0,5228	0,0000	0,5228	0,0000	1,80	1,8100
3	0,5326	0,0000	0,5326	0,0000	1,83	1,8100
4	0,5129	0,0534	0,5663	0,0051	2,62	2,5428
5	0,5091	0,0524	0,5615	0,0050	2,35	2,5352
6	0,5536	0,0505	0,6041	0,0048	2,41	2,4596
7	0,5389	0,1064	0,6453	0,0102	2,89	3,0913
8	0,5352	0,1044	0,6396	0,0100	2,82	3,0785
9	0,5734	0,1055	0,6789	0,0101	2,70	3,0176
10	0,5473	0,2134	0,7607	0,0204	3,90	3,9901
12	0,5026	0,2092	0,7118	0,0200	3,89	4,0940
13	0,5005	0,2028	0,7033	0,0194	3,78	4,0509

N = nitrogênio; R = replicata

O valor teórico do nitrogênio da matriz em estudo é calculado fazendo-se a média aritmética das replicatas 1, 2 e 3.

### Efeito Matriz na Recuperação de Nitrogênio em Farinha de Trigo

Repl.	Conc. Teórico	Conc. Experimental	Erro (%)	Erro (%) Médio
4	2,453	2,6200000	3,04	4,12
5	2,535	2,3500000	7,31	
6	2,460	2,4100000	2,02	
7	3,091	2,8900000	6,51	8,48
8	3,078	2,8200000	8,40	
9	3,018	2,7000000	10,53	
10	3,990	3,9000000	2,26	4,64
11	4,094	3,8900000	4,98	
12	4,051	3,7800000	6,69	

### Recuperação de Nitrogênio em Farinha de Trigo

Repl.	Recuperação	Média
4	103,04	97,90
5	92,69	
6	97,98	
7	93,49	91,52
8	91,60	
9	89,47	
10	97,74	95,36
12	95,02	
13	93,3	

A recuperação é calculada pela fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left[ \frac{\text{Conc. Exp.}}{\text{Conc. Teórico.}} \right] \times 100.$$

Onde:

Conc. Exp = concentração obtida experimentalmente na matriz fortificada.

Conc. Teórico = concentração determinada na matriz não fortificada.

Os dados obtidos foram lançados e calculados em planilha do *Software Excel*.

### Resultados dos ensaios

LD e LQ

$LD = \bar{X} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s$	$LQ = \bar{X} + 5s$
$LD = 0,1112 = 0,11$	$LQ = 0,1296 = 0,13$

$t = 3,00$ , para 98% de confiança.

A faixa inferior de trabalho é definida pelo limite de quantificação - 0,13%

A faixa superior de trabalho pode ser estabelecida de acordo com a máxima quantidade de nitrogênio que ocorre na maioria das proteínas presentes em alimentos (15,7%).

Faixa de trabalho: 0,13% a 15,7%

### Repetitividade

Aos dados obtidos das 10 replicatas das matrizes em estudo foi aplicado o Teste de Grubbs e os resultados não apresentaram dispersão.

Foram calculados a média, o desvio padrão e a variância dos dados obtidos, e, a partir destes, foi calculado o limite de repetitividade (r).

$$r = t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot \sqrt{2} \cdot s$$

Onde:

t = distribuição de Student dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança.

s = desvio padrão amostral associado aos resultados considerados.

<p>1 – Alimentos de origem animal</p> <p>Média = 1,214</p> <p>Desvio padrão (S) = 0,026</p> <p>Variância (V) = 0,001</p> <p>t = 2,82, para 98% de confiança.</p> <p>Limite de repetitividade (r) = 0,105</p>	<p>2 – Lácteos</p> <p>Média = 2,594</p> <p>Desvio padrão (S) = 0,036</p> <p>Variância (V) = 0,001</p> <p>t = 2,82, para 98% de confiança.</p> <p>Limite de repetitividade (r) = 0,142</p>
<p>3 – Alimentos de origem vegetal</p> <p>Média = 6,671</p> <p>Desvio padrão (S) = 0,048</p> <p>Variância (V) = 0,002</p> <p>t = 2,82, para 98% de confiança.</p> <p>Limite de repetitividade (r) = 0,190</p>	<p>4 – Alimentos processados</p> <p>Média = 1,054</p> <p>Desvio padrão (S) = 0,020</p> <p>Variância (V) = 0,000</p> <p>t = 2,82, para 98% de confiança.</p> <p>Limite de repetitividade (r) = 0,080</p>

<p>5 – Bebidas não alcoólicas</p> <p>Média = 0,000</p> <p>Desvio padrão (S) = 0,000</p> <p>Variância (V) = 0,000</p> <p>t = 2,82, para 98% de confiança.</p> <p>Limite de repetitividade (r) = 0,000</p>	
--	--

### Precisão intermediária

Cálculo do desvio padrão da precisão intermediária:

$$Spi_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - y_j)^2}$$

Onde:

t = total de amostras ensaiadas

n = total de ensaios efetuados por amostra

j = nº da amostra, j = 1, t

k = nº do ensaio da amostra j, k=1, n

y<sub>jk</sub> = valor do resultado de k para a amostra j

Y<sub>j</sub> = representa a média aritmética dos resultados da amostra j.

1 – Alimentos de origem animal	Média: 1,25 Desvio Padrão da precisão intermediária (Spi): 0,08
2 – Lácteos	Média: 2,64 Desvio Padrão da precisão intermediária (Spi): 0,02
3 – Alimentos de origem vegetal	Média: 6,63 Desvio Padrão da precisão intermediária (Spi): 0,14
4 – Alimentos processados	Média: 1,07 Desvio Padrão da precisão intermediária (Spi): 0,02
5 – Bebidas não alcoólicas	Média: 0,00 Desvio Padrão da precisão intermediária (Spi): 0,00

### Exatidão

#### Recuperação

Replicata	Recuperação	Média
4	103,04	97,90
5	92,69	
6	97,98	
7	93,49	91,52
8	91,60	
9	89,47	
10	97,74	95,36
11	95,02	
12	93,31	

Resultados de Interlaboratoriais satisfatórios em matrizes diversas

Provedor	Matriz	Z
EPLNA	Bagaço de cana de açúcar	-1,3
EPLNA	Polpa de laranja	0,7
EPLNA	Alfafa	0,7
EPLNA	Quirela de milho	0,2
EPLNA	Quirela de milho	-0,4
EPLNA	Capim Xaraes	0,1
EPLNA	Paspalum	-1,1
EPLNA	Paspalum	-1,5
EPLNA	Farelo de arroz	-1,8
EPLNA	Capim Guandu	0,0
Rede Metrológica	Patê de frango	0,4
Cientec	Espinafre em pó	0,0
Cientec	Feijão em pó	0,5

Z – score ( -2 ≤ z ≤ 2 ) para resultados satisfatórios.

### Discussão dos dados

O ensaio do branco com a matriz mamão apresentou média de 0,08 e desvio padrão de 0,009, indicando que o nível de detecção do analito, isto é, quando este pode ser distinguido do sinal do branco será a partir de 0,11, enquanto que o limite de quantificação será de 0,13.

A faixa de trabalho de 0,13% a 15,7% foi estabelecida de acordo com a faixa inferior de trabalho, definida pelo limite de quantificação, que foi de 0,13%, enquanto que a faixa superior de trabalho foi estabelecida de acordo com a máxima quantidade de nitrogênio que ocorre na maioria das proteínas presentes em alimentos (15,7%).

O limite de repetitividade do método apresentado no quadro abaixo mostra os valores obtidos para uma matriz pertencente a cada uma das subáreas de atividade conforme a NIT-DICLA – 016 (INMETRO, 2011a) e definindo que as diferenças entre as replicatas devem apresentar valor  $\leq r$ .

Sub-área de atividade	Matriz	$\leq r$
Alimentos de origem animal	Patê de presunto	0,08
Lácteos	Leite em pó	0,02
Alimentos de origem vegetal	Farinha de soja	0,14
Alimentos processados	Biscoito	0,02
Bebidas não alcoólicas	Suco de maçã	0,00

Em relação aos dados obtidos no teste da precisão intermediária para as matrizes selecionadas, pertencentes a cada uma das subáreas de atividades, foram observados valores para o desvio padrão da precisão intermediária (Spi) variando de 0,00 a 0,14. Portanto a variabilidade dos resultados obtidos no laboratório de físico-química deve apresentar entre  $\leq 0,00$  a  $\leq 0,14$ , de acordo com cada subárea.

O teste de recuperação apresentou o valor de 97,90% para cerca de 2,5% de adição de padrão, 91,52% para cerca de 3,00% e o valor de 95,36% para cerca de 4,00%, mostrando estar dentro da faixa de recuperação estabelecida de 70 a 110% pelo *Codex Alimentarius Commission*.

## Conclusão

Os descritores aplicados demonstraram ser adequados para se concluir que o método de determinação de nitrogênio total está validado para uma gama de matrizes. A aplicação dos critérios estabelecidos no documento de caráter orientativo DOQ-CGRE-008 (INMETRO, 2011b) indicou, de acordo com os resultados obtidos, que o método de nitrogênio total está validado para as matrizes representativas de cada subárea de atividade conforme descrito pelo INMETRO (2011a) na NIT-DICLA-016.

## Referências

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 18th ed., rev. Gaithersburg, MD, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005. 31 p.

INMETRO. **NIT-DICLA 016**: elaboração de escopo de ensaios. Rio de Janeiro, 2011a. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Dicla/NIT/NIT-Dicla-16\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Dicla/NIT/NIT-Dicla-16_04.pdf)>. Acesso em: 2 out. 2012.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo: DOQ-CGRE-008: revisão 04-jul/2011. Rio de Janeiro, 2011b. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/.../CGCRE/DOQ/DOQ-CGRE-8\\_03.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/.../CGCRE/DOQ/DOQ-CGRE-8_03.pdf)>. Acesso em: 21 ago. 2012.

### Comunicado Técnico, 184

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Agroindústria de Alimentos**  
**Endereço:** Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba  
 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ  
**Fone:** (0XX21) 3622-9600  
**Fax:** (0XX21) 3622-9713  
**Home Page:** <http://www.ctaa.embrapa.br>  
**E-mail:** [ctaa.sac@embrapa.br](mailto:ctaa.sac@embrapa.br)

1ª edição

1ª impressão (2012): tiragem (20 exemplares)

### Comitê de Publicações

**Presidente:** Virgínia Martins da Matta  
**Membros:** André Luis do Nascimento Gomes, Daniela De Grandi Castro Freitas, Luciana Sampaio de Araújo, Ilana Felberg, Marília Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Galhardo Borguini, Renata Torrezan

### Expediente

**Supervisão editorial:** Daniela De Grandi C. Freitas  
**Revisão de texto:** Janine Passos Lima da Silva  
**Normalização bibliográfica:** Luciana S. de Araújo  
**Editoração eletrônica:** André Luis do N. Gomes, Gabriel Gomes de Sousa e Marcos Moulin