

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Avaliação de risco e exposição alimentar a nitrato e nitrito de utentes de cantina escolar

Rafaela Alberto Teixeira Fernandes

Mestrado em Química
Especialização em Química Analítica

Dissertação orientada por:
Doutora Cristina Maria Roque Ramiro Oliveira
Doutor Ricardo Jorge Neves Bettencourt da Silva

Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha gratidão a todos os que contribuíram, por diversos meios, para a finalização da dissertação, em particular, queria agradecer

Aos meus orientadores Doutora Cristina Oliveira e Doutor Ricardo Bettencourt da Silva, pela oportunidade de desenvolver um trabalho na minha área de interesse, pela ajuda, disponibilidade e conhecimentos transmitidos ao longo deste percurso.

À Prof. Filomena Martins pelo apoio a nível laboratorial e o empréstimo de consumíveis essenciais à realização do trabalho. À Doutora Bárbara Anes e Dra. Joana José pelo auxílio no manuseamento do equipamento e apoio moral.

Aos meus pais pelo apoio indispensável no decorrer deste projeto.

Resumo

A crescente utilização de nitrito e nitrato nas indústrias alimentar e agrícola, como conservantes e fertilizantes, continua a ser motivo de inquietação devido à sua atuação como precursores de compostos potencialmente cancerígenos, nomeadamente, as *N*-nitrosaminas. Usualmente, a ingestão de nitrito e nitrato é estimada pela soma das concentrações destes analitos nos diferentes alimentos, não refletindo as interações entre os diversos alimentos nem a variação de concentrações para o mesmo alimento. Nesta dissertação, pretende-se avaliar o risco de ingestão de nitrito e nitrato, utilizando amostras que simulem a diversidade do consumo alimentar, admitindo uma dieta mediterrânea. Para tal, estes analitos foram extraídos, em água quente, recorrendo à agitação magnética, de refeições provenientes de uma cantina escolar, previamente trituradas. Utilizando a técnica de cromatografia de troca iónica com deteção UV-Vis a 205 nm, determinaram-se as concentrações de analito, posteriormente utilizadas na avaliação de risco. Para além da concentração de analito, foram ainda simulados o peso do utente e peso da refeição, pelo método Monte Carlo numa folha de cálculo MS-Excel. Concluiu-se, pela análise de 50 refeições e 9999 simulações, que existe um risco de 0,16 % de ultrapassar a dose diária admissível para o consumo de nitrato, admitindo somente o consumo de duas refeições da cantina por dia. Não foi possível confirmar a presença de nitrito.

Palavras-chave Nitrito, Nitrato, Avaliação de risco, método de Monte Carlo, Refeições.

Abstract

The growing use of nitrite and nitrate in food and agriculture industries as preservatives and fertilizers, is still a source of discomfort due to its action as precursors for potential carcinogenic molecules such as *N*-nitrosamines. Usually, ingestion of nitrite and nitrate is estimated by the sum of the concentrations of these analytes in the different components of the dish, without consideration for the interactions between them or the change in concentration for the same component. On this dissertation, the risk of nitrite and nitrate ingestion was assessed in samples that reflect human consumption, considering the Mediterranean diet. The extraction of these analytes from meals sourced from a school canteen was done using hot water and magnetic agitation. Concentration of analyte was determined by ionic exchange chromatography with UV-Vis detection at 205 nm. These concentrations, the weight of the consumer as well as the meal weight were all simulated by application of the Monte Carlo method on an MS-Excel spreadsheet. Through the analysis of 50 meals and 9999 simulations, it was concluded that there is a 0.16 % chance of consuming over the acceptable daily intake stipulate for nitrate consumption, by exclusive consumption of two canteen meals a day. It was not possible to confirm the presence of nitrite.

Key-Words Nitrite, Nitrate, Risk Evaluation, Monte Carlo method, Meals.

Índice

1	Introdução	3
1.1	Métodos de extração de nitrito e nitrato em amostras alimentares	5
1.2	Determinação de nitrito e nitrato em amostras alimentares	5
1.2.1	Métodos cromatográficos	5
1.3	Avaliação da incerteza da medição	11
1.3.1	Definição da mensuranda	12
1.3.2	Identificação de fontes de incerteza	12
1.3.3	Quantificação de fontes de incerteza	13
1.3.4	Combinação de fontes de incerteza	13
1.3.5	Cálculo da incerteza expandida	17
2	Metodologia experimental	18
2.1	Validação do método instrumental de análise	18
2.2	Recolha de refeições	19
2.3	Procedimento de extração de analitos	20
2.4	Procedimento de análise por cromatografia de troca iónica	20
2.5	Ensaio de recuperação	20
2.6	Avaliação de risco	21
2.7	Alterações ao protocolo experimental	24
2.7.1	Contribuição dos acompanhamentos hortícolas para a concentração de analito	24
2.7.2	Contribuição de cada componente da refeição para a concentração de analito	24
3	Apresentação e discussão de resultados	26
3.1	Validação do método instrumental de análise de nitrito e de nitrato	26
3.2	Análise de cromatogramas de refeições	27
3.3	Nitrito	29
3.4	Nitrato	31
3.4.1	Avaliação de risco de ingestão de nitrato	32
3.4.2	Possíveis fontes de nitrato	33
3.4.3	Impacto das condições de armazenamento no teor de nitrato	38
4	Conclusões	40
5	Perspetivas futuras	40
6	Bibliografia	41
7	Anexos	44

Índice de Figuras

Figura 1.1 Sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma mesma solução que contém simultaneamente os iões cloreto, nitrito e nitrato. No cromatograma de deteção por condutividade, da esquerda para a direita, os picos correspondem aos iões cloreto, nitrito e nitrato. No cromatograma de deteção por UV-Vis, da esquerda para a direita, os picos correspondem aos iões nitrito e nitrato. Ambas as análises foram realizadas pelo mesmo sistema cromatográfico.....	8
Figura 2.1 Detalhe da folha de cálculo usada para avaliar a incerteza dos calibradores. ²⁵	18
Figura 2.2 Detalhe da folha de cálculo usada na identificação de valores aberrantes únicos, emparelhados e antagónicos através de testes de Grubbs. ²⁵	19
Figura 2.3 Detalhe da folha de cálculo usada para a verificação de homogeneidade de variâncias e linearidade. ²⁵	19
Figura 2.4 Detalhe da folha de cálculo usada para a verificação de conformidade de padrões de controlo com o modelo de regressão semanal.	19
Figura 2.5 Detalhe da folha de cálculo usada para execução do método Monte Carlo para avaliar o risco de exposição ao analito por ingestão de duas refeições da cantina.	22
Figura 2.6 Detalhe da folha de cálculo onde se encontram compiladas todas as simulações da fração mássica de analito na refeição, w	23
Figura 3.1 Gráfico de resíduos obtido em função dos sinais instrumentais dos calibradores para a determinação de nitrito.	26
Figura 3.2 Gráfico de resíduos obtido em função dos sinais instrumentais dos calibradores para a determinação de nitrato.	27
Figura 3.3 Cromatogramas obtidos por análise das refeições recolhidas no mês de abril nas condições cromatográficas mencionadas em 2.4.....	27
Figura 3.4 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise do calibrador mais concentrado e da amostra recolhida a 26 de março de 2024 nas condições cromatográficas mencionadas em 2.4..	28
Figura 3.5 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise da amostra recolhida a 18 julho de 2024 e posteriores diluições e fortificações com os iões acetato (a), ascorbato (b) e brometo (c). Os cromatogramas foram obtidos nas condições de 2.4.	28
Figura 3.6 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de diluições e fortificações do extrato da refeição de 26 de março de 2024. Os cromatogramas foram obtidos nas condições cromatográficas de 2.4.	29
Figura 3.7 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise da diluição 1:2 e da fortificação do extrato da refeição de 02 de abril de 2024. Os cromatogramas foram obtidos nas condições cromatográficas de 2.4.	30
Figura 3.8 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise da diluição e fortificação do extrato da refeição de 03 de junho de 2024. Os cromatogramas foram obtidos nas condições cromatográficas de 2.4.	31
Figura 3.9 Simulação da quantidade de nitrato ingerida numa refeição da cantina por massa corporal do utente. As retas verticais escuras delimitam, da esquerda para a direita os percentis $P_{2,5}$ e $P_{97,5}$...	33
Figura 3.10 Simulação da quantidade de nitrato ingerida em duas refeições diárias da cantina por massa corporal do utente. As retas verticais claras delimitam, da esquerda para a direita os percentis $P_{2,5}$ e $P_{97,5}$	33
Figura 3.11 Fração mássica de nitrato w em cada refeição analisada, por ordem cronológica de recolha. As barras de erro representam a incerteza expandida $U(w)$ ($nc = 95 \%$, $k = 2$). As retas verticais delimitam o mês em que foram recolhidas as refeições.	34

Figura 3.12 Sobreposição dos cromatogramas referentes à análise da refeição de 30 de abril de 2024 com e sem acompanhamentos hortícolas, nomeadamente, mistura de alfaces. Os cromatogramas foram obtidos nas condições cromatográficas de 2.4.	34
Figura 3.13 Fração mássica de nitrato para quatro refeições recolhidas a 09 (alface) e 30 de abril de 2024 (mistura de alfaces), 13 de maio de 2024 (grelos salteados) e 06 de junho de 2024 (alface e cenoura) evidenciando uma diminuição da fração mássica de nitrato da refeição com e sem produtos hortícolas de 80 %, 61 %, 48 % e 83 %, respetivamente. As barras de erro representam a incerteza expandida $U(w)$ ($nc = 95 \%$, $k = 2$).	35
Figura 3.14 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise da refeição recolhida a 02 de maio de 2024. Os cromatogramas foram obtidos nas condições cromatográficas de 2.4.	36
Figura 3.15 Contribuição percentual de cada componente para a quantidade de nitrato presente na refeição recolhida a 02 de maio de 2024.	36
Figura 3.16 Fração mássica de nitrato, w em cada refeição analisada por ordem cronológica de recolha. As barras de erro representam a incerteza expandida $U(w)$ ($nc = 95 \%$, $k = 2$).	37
Figura 3.17 Concentração mássica de nitrato no extrato da refeição recolhida a 21 de março. As barras de erro representam a incerteza expandida $U(\gamma)$ ($nc = 95 \%$, $k = 2$). Por ordem cronológica, foram obtidas as concentrações de $(0,28 \pm 0,07) \text{ mg L}^{-1}$, $(0,30 \pm 0,11) \text{ mg L}^{-1}$, $(0,32 \pm 0,12) \text{ mg L}^{-1}$, $(0,39 \pm 0,06) \text{ mg L}^{-1}$ e $(0,37 \pm 0,04) \text{ mg L}^{-1}$	38
Figura 3.18 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise do impacto do armazenamento da refeição de 02 de maio de 2024. A análise do cromatograma do extrato da refeição indica uma concentração de nitrato de $(1,32 \pm 0,07) \text{ mg L}^{-1}$. A análise do extrato da refeição cujo processo de extração foi realizado a 15 de maio de 2024 indica uma concentração de nitrato é de $(0,66 \pm 0,06) \text{ mg L}^{-1}$ ($nc = 95\%$, $k = 2$). Os cromatogramas foram obtidos nas condições cromatográficas de 2.4.	39

Índice de tabelas

Tabela 1.1 Representação esquemática da implementação do método de Monte Carlo para a simulação do valor medido y , função das variáveis de entrada x_A , x_B e x_C	16
Tabela 2.1 Parâmetros de preparação de ensaios de recuperação de analito realizados para refeições recolhidas nos meses de abril e junho. γ - concentração mássica de analito no calibrador, m_c , m_e e m_t - massas de calibrador, de extrato e total, respetivamente, utilizadas para cada ensaio.....	21
Tabela 2.2 Massas referentes às pesagens dos diferentes componentes da refeição recolhida a 08 de julho de 2024.....	22
Tabela 2.3 Descrição qualitativa do componente “salada” para as refeições sujeitas à alteração acima referida no procedimento experimental.....	24
Tabela 3.1 Áreas e tempos de retenção relativos ao nitrito obtidos pela análise cromatográfica, em duplicado, da amostra e da amostra fortificada e concentração mássica estimada pela folha de cálculo, conforme mencionado em 2.1	30
Tabela 3.2 Compilação dos resultados dos ensaios de recuperação referentes ao nitrito.....	31
Tabela 3.3 Áreas e tempos de retenção relativos ao nitrato obtidos pela análise cromatográfica, em duplicado, da amostra e da amostra fortificada e concentração estimada pela folha de cálculo, conforme mencionado em 2.1	32
Tabela 3.4 Compilação dos resultados dos ensaios de recuperação referentes ao nitrato.....	32
Tabela 3.5 Fração mássica de nitrato dos vários componentes da refeição em mg por g de componente da refeição de 02 de maio de 2024.....	36
Tabela 3.6 Descrição qualitativa das três refeições com maior fração mássica de nitrato na refeição, por ordem decrescente de fração mássica de nitrato.....	37
Tabela 3.7 Descrição qualitativa das três refeições com menor fração mássica de nitrato na refeição, por ordem crescente de fração mássica de nitrato.....	38

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

A - Área
 \bar{A} - Área média
ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
DDA – Dose diária admissível
EN – Norma europeia, do inglês *European Norm*
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
IC – Cromatografia de troca iónica, do inglês *Ionic chromatography*
 k – Fator de expansão
 m_a – Massa de água ultrapura
MAE - Extração por microondas, do inglês *Microwave assisted extraction*
 m_c – Massa de calibrador
 m_e – Massa de extrato
MS-Excel – Microsoft Excel
 n_c – Nível de confiança
 p – Peso do consumidor
PTFE - Politetrafluoretileno, do inglês *Polytetrafluoroethylene*
QI – Quantidade ingerida
 R – Recuperação
SFE – Extração por fluido supercrítico, do inglês *Supercritical fluid extraction*
SPE – Extração por fase sólida, do inglês *Solid-phase extraction*
 t_r – Tempo de retenção
 u – Incerteza padrão
UAE – Extração por ultrassons do inglês *Ultrasonic assisted extraction*
 u_c – Incerteza padrão combinada
UV-Vis – Ultravioleta visível
 U – Incerteza expandida
 V – Volume
 w – Fração mássica de analito
 γ – Concentração mássica de analito
 λ – Comprimento de onda

1 Introdução

A 17 de agosto de 1972 foi publicado, em Portugal, o Decreto-Lei n.º 314/72,¹ um diploma que visa a rotulagem de géneros alimentícios pré-embalados, com o objetivo de definir e sistematizar, no âmbito da defesa do consumidor, certos princípios, estabelecendo uma “generalização que lhe confira maiores eficácia e alcance”. De todas as menções que são obrigatórias constar no rótulo destaca-se a “relação dos ingredientes”. A população utiliza esta informação para diversos fins, nomeadamente, calcular a quantidade de proteína consumida, prática comum em indivíduos que praticam desporto, e cada vez mais utilizada por pessoas que praticam uma dieta vegetariana e procuram substituir a proteína animal por vegetal. Doentes com diabetes e até mesmo hipertensos beneficiam da informação disponibilizada na rotulagem relativamente à quantidade de açúcar e sal. Estar atento à quantidade de açúcar é uma prática também comum em figuras parentais responsáveis pela alimentação de menores. Recentemente, com a expansão do mercado da comida processada, verifica-se uma crescente preocupação com a utilização de aditivos e conservantes. No seguimento deste interesse sobre o que ingerimos, este trabalho visa avaliar o risco e exposição a nitrito e nitrato em refeições de uma cantina escolar.

O nitrito e o nitrato são aniões com um papel multifuncional no metabolismo das plantas e seres humanos, sendo por isso considerados essenciais à vida. Para os humanos, o consumo de nitrato² leva a uma diminuição da pressão sanguínea, a uma maior resistência à insulina e tolerância à glucose, para além dos diversos benefícios para o sistema cardiovascular. Os alimentos são a principal fonte de exposição ao nitrato,³ em particular, os produtos hortícolas representam 80 % a 94 % de todo o nitrato ingerido na dieta humana. A produção endógena é a principal responsável pela exposição humana a nitrito,⁴ em particular, cerca de 80 % dessa exposição provém do processo de salivacão na cavidade oral. Somente 5 % do nitrato consumido é reduzido a nitrito pelas bactérias saprófitas presentes na língua.⁴

Inicialmente, a escolha destes analitos aparenta ser algo heterodoxa, mas a ampla utilização dos mesmos na indústria alimentar e agrícola esclarece-a. Na indústria alimentar, os seus sais de potássio e sódio atuam como aditivos (E-249 a E-252) no fabrico de produtos curados, maioritariamente cárneos. O processo de cura⁵ é uma técnica de preservação de alimentos que remonta à Antiguidade e consiste na utilização de sais de nitrito e/ou nitrato para reduzir o teor em água disponível para atividade biológica no alimento. Os principais benefícios da utilização destes sais são a conservação por inibição do crescimento de microrganismos⁶ como *Clostridium botulinum* – que pode originar intoxicações alimentares, e o enaltecimento de características organolépticas⁷ como o sabor, o cheiro e a cor. Atualmente, a utilização destes aditivos encontra-se legislada pela União Europeia para uma variedade de produtos e processos mais comuns. Considerando os diferentes processos de cura tradicionais, foram estabelecidas restrições específicas. A título de exemplo, para os produtos cárneos entremada, entrecosto e toucinho fumado, o valor de limite máximo que pode ser adicionado de nitrito de potássio⁸ (E-249) e nitrito de sódio (E-250) é de 175 mg kg⁻¹; e o valor de limite máximo para nitrato de potássio⁹ (E-251) e nitrato de sódio (E-252) é de 250 mg kg⁻¹. Na indústria agrícola, o uso excessivo de fertilizantes azotados¹⁰ popularizou-se como resposta à produção em massa, originando uma acumulação de nitrato nos vegetais. A quantidade de nitrato acumulado depende de vários fatores como o tipo de fertilizante e o seu modo de emprego, o tamanho da colheita, tempo de armazenamento, fatores genéticos, exposição solar, temperatura, entre outros. Por exemplo, em climas mais solarengos e quentes, a acumulação de nitrato^{2,10} em vegetais é menor. A quantidade de nitrato ingerida por consumo de vegetais depende da parte do vegetal consumida e do modo de confeção. Por estas razões, a mesma espécie pode apresentar uma vasta gama de concentrações deste ião, por exemplo, o espinafre pode apresentar teores¹⁰ entre 2 mg kg⁻¹ e 6700 mg kg⁻¹ de NO₃⁻.

Apesar do nitrato não ser prejudicial à saúde, inclusive cerca de 70 % é expelido através da urina, a sua conversão em nitrito, que é tóxico e, por sua vez, se transforma em *N*-nitrosaminas, torna-o num precursor de moléculas com potencial maligno. Um dos principais riscos associado à presença de nitrito no organismo é a síndrome¹¹ do bebé azul, onde o nitrito oxida o ião Fe^{2+} , presente na hemoglobina, a Fe^{3+} formando a meta-hemoglobina, uma proteína incapaz de transportar oxigénio, levando à morte por asfixia em crianças com menos de um ano de idade visto que estas ainda não possuem a meta-hemoglobina redutase. A formação de *N*-nitrosaminas^{5,12} é estimulada em meios ácidos, como o estômago, onde o nitrito adquire um próton, formando o ácido nitroso. Este ácido é extremamente reativo e interage com outros elementos presentes nos alimentos consumidos como o carbono, enxofre e oxigénio, iniciando o processo de nitrosação, ou seja, conversão de compostos orgânicos nos seus derivados nitrosos. Quando o componente orgânico é uma amina secundária, este processo leva à formação de *N*-nitrosaminas. Esta reação poderia levar-nos a acreditar que um alimento com uma maior quantidade de nitrato ou nitrito representaria um maior perigo para a saúde. Apesar disto, alimentos hortícolas,^{12,13} ricos em nitrato, contêm também componentes inibidores do processo de nitrosação como as vitaminas, em particular C e E, os antioxidantes e os polifenóis. Por outro lado, os produtos cárneos¹² apresentam quantidades superiores de amins secundárias e alto teor em ferro, estimulando o processo de nitrosação e aumentando o seu potencial cancerígeno. Eventualmente, uma grande diversidade de grupos substituintes nas amins secundárias resultará numa igual diversidade de nitrosaminas, tornando a sua monitorização e avaliação de risco para a saúde extremamente difícil. Desta forma, a União Europeia decidiu monitorizar os precursores: nitrito e nitrato. Por exemplo, a alface (exceto a “iceberg”) pode ter um valor máximo de nitrato¹⁴ até 4 000 mg kg⁻¹, caso seja colhida de 1 de outubro a 31 de março e cultivada ao ar livre. Para além disto, a União Europeia estabeleceu ainda valores para a dose diária admissível de 3,7 mg kg⁻¹ de peso corporal para nitrato e 0,07 mg kg⁻¹ de peso corporal para nitrito.¹⁵

Maioritariamente, os estudos que examinam a ingestão destes analitos focam-se somente num alimento em particular, como espinafre, alface ou salsicha, ainda que exista comparação entre várias tipologias, quer em termos de espécie vegetal ou animal, local de colheita, ou método de processamento. Estes resultados não refletem a quantidade ingerida por refeição e, conseqüentemente, não é possível determinar um valor diário comparável com a dose diária recomendável. Outros estudos, onde já é considerada a dieta do consumidor, calculam a quantidade diária consumida de nitrito e nitrato por pessoa, utilizando valores obtidos experimentalmente, presentes na literatura. Este método é desvantajoso, uma vez que a quantidade destes analitos presente nos alimentos está dependente de diversos fatores, previamente descritos, e a eventual ingestão estará também dependente do método de confeção¹⁶ destes alimentos, onde se refletem várias diferenças culturais. Estas desvantagens somam-se às dificuldades já apresentadas nestes estudos, como a dificuldade do consumidor em lembrar todos os alimentos consumidos e o controlo das quantidades consumidas devido ao recurso a medidas caseiras, como a “pitada” ou “punhado”. Pysz¹⁷ contornou estes problemas utilizando como amostra refeições preparadas por instituições que têm em conta proporções, cozinha local e produtos sazonais, neste caso por vários orfanatos sediados na Polónia.

1.1 Métodos de extração de nitrito e nitrato em amostras alimentares

Como os iões nitrito e nitrato são solúveis em água e absorvem a um comprimento de onda de 205 nm, o processo mais comum consiste em extraí-los para uma fase líquida e proceder à sua análise por métodos espectrofotométricos.^{2,13,18,19} Considerando a amostra no estado sólido, os analitos podem ser extraídos para uma fase líquida através de várias técnicas de extração, destacando-se a extração por utilização de ultrassons (UAE), de micro-ondas (MAE), de fluido supercrítico (SFE) ou por fase sólida (SPE). Convenientemente, o método mais comum de extração de nitrito e nitrato em amostras alimentares implica apenas a utilização de água quente, inclusive, o procedimento recomendado pela norma europeia¹⁸ EN 12014-4:2005 inclui a utilização de água a uma temperatura entre os 50 °C e 60 °C. Nesta norma é ainda mencionado o uso de acetonitrilo com o intuito de remover interferentes. Para uma aplicação semelhante, podem ser utilizados outros reagentes como o reagente de Carrez, para a precipitação de proteínas, e carvão ativado.^{16,19}

1.2 Determinação de nitrito e nitrato em amostras alimentares

Ao longo dos anos estudaram-se várias técnicas para otimizar a determinação de nitrito e nitrato em diversas matrizes, entre as quais espectrofotometria, potenciometria, polarografia, eletroforese capilar e cromatografia¹⁶. Segundo a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE),²⁰ os principais métodos utilizados na análise de nitrato são a cromatografia iónica, a potenciometria -elétrodo seletivo de nitrato, e a espectrofotometria de absorção molecular, preferindo-se os métodos espectrofotométricos devido à relação sensibilidade-custo e à facilidade de manuseamento.

O método de Cataldo²¹, vastamente utilizado na quantificação de nitrato em alface, baseia-se na formação de um composto colorimétrico que absorve a um comprimento de onda de 410 nm. Este composto é sintetizado a partir da nitrosação de ácido salicílico e, neste método, os aniões amónio, nitrito e cloreto não atuam como interferentes. É vantajoso devido ao seu baixo custo, contudo a necessidade de desidratar/secar a amostra de planta torna a análise demorada.

Um dos métodos espectrofotométricos mais utilizados é o método colorimétrico de Griess. Por este método,¹⁷ o ião nitrito reage com a sulfanilamida (Griess I) formando um sal de diazónio. Este sal combina-se com *N*-(1-naftil)-etilenodiamina (Griess II) levando à formação de um composto cromóforo detetável a comprimentos de onda compreendidos entre 520 nm¹⁶ e 540 nm²². A sua principal desvantagem é não ser possível quantificar o ião nitrato diretamente, sendo necessário reduzi-lo a nitrito¹⁶ com recurso ao cádmio metálico, sob a forma de pós, esponjas ou de colunas. Apesar de se tratar de um método moroso,¹⁶ ainda é utilizado uma vez que o avanço da tecnologia permitiu a sua utilização em fluxo, levando a uma redução do trabalho e tempo despendido para a análise. Em muitas aplicações foi substituído por técnicas como a cromatografia de troca iónica (IC).

1.2.1 Métodos cromatográficos

Como anteriormente indicado, existem diversos métodos analíticos que permitem a identificação e até mesmo quantificação de componentes de uma dada amostra, por exemplo, a espectrometria de massa, espectroscopia molecular, absorção atómica e a cromatografia. Os métodos cromatográficos²³ são amplamente preferidos na análise de misturas complexas por permitem ainda a separação de componentes, simplificando a interpretação dos resultados. De forma geral, esta separação é realizada por métodos físicos onde a amostra, incluída numa fase móvel, se move com uma direção definida, ao longo de uma coluna cromatográfica, interagindo

com o seu revestimento, a fase estacionária. A diferença de afinidade entre cada componente presente na amostra e a fase estacionária leva a diferenças na velocidade de deslocamento destes analitos e, conseqüentemente, a diferenças no tempo em que permanecem na coluna. Este tempo representa um parâmetro analítico denominado por tempo de retenção.

O exemplo acima descreve uma cromatografia onde o suporte da fase estacionária é uma coluna, contudo também é possível obter a separação de componentes utilizando como suporte papel, através da técnica de cromatografia planar. Aliás, existe uma variedade de sistemas cromatográficos que dão resposta às diferentes dificuldades analíticas. Estes sistemas podem ser classificados²³ pelo suporte da fase estacionária (cromatografia em coluna ou planar), pela natureza física da fase móvel (gás, líquido ou fluido supercrítico) e pelo mecanismo do processo de distribuição (partição, absorção, permuta iónica, afinidade ou exclusão molecular). A escolha do método mais adequado é imposta pelas características do analito. Para moléculas de pequenas dimensões, solúveis em água e iónicas, a técnica recomendada é a cromatografia por troca iónica.²³

1.2.1.1 Cromatografia de troca iónica

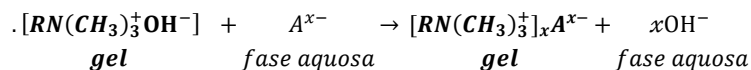
O sistema de cromatografia líquida de troca iónica é constituído, genericamente, por um reservatório de solvente, uma bomba, um injetor, uma coluna, um detetor e um sistema de processamento de dados/*software*.²³

Os solventes utilizados devem apresentar um elevado grau de pureza e quando necessárias misturas de solventes ou concentrações diferentes do mesmo, estas devem ser preparadas recorrendo a água ultrapura. O reservatório de solvente está conectado a uma bomba, cuja função é garantir que o solvente e a amostra (fase móvel) se movem na mesma direção, a um fluxo constante pré-determinado pelo operador, via *software*. Alguns aparelhos permitem a utilização de dois modos de eluição: isocrático (a composição da fase móvel é constante), ou por gradiente (a fase móvel apresenta composição variável de dois ou mais solventes ao longo da análise, indicado para a análise de analitos com polaridades muito diferentes.

A amostra pode ser introduzida no sistema por um auto-amostrador, ou injetada manualmente. Para garantir a repetibilidade dos resultados é necessário que o volume de amostra injetado seja igual em todas as análises. Por isso existe o *loop*, um tubo com uma capacidade volúmica pré-definida, presente na válvula de injeção. Quando esta válvula se encontra na posição de enchimento, o utilizador insere a amostra no sistema, sendo este tubo preenchido pela mesma, não existindo contacto entre a amostra e o solvente. Na posição de injeção, o solvente arrasta a amostra no *loop* para a pré-coluna.

A pré-coluna ou coluna de guarda,²³ aumenta o tempo de vida da coluna principal, protegendo-a de partículas, componentes menos solúveis na fase móvel, entre outros contaminantes. Para tal, esta deve apresentar uma fase estacionária com a mesma composição que a coluna principal e um comprimento reduzido, evitando o início da separação dos compostos. Apesar de não ser essencial ao sistema cromatográfico, é frequentemente utilizada uma vez que é economicamente mais viável a sua substituição face à coluna principal.

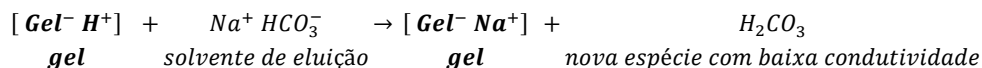
Na cromatografia de troca iónica,²³ o revestimento da coluna é composto por um gel de permuta iónica, insolúvel em meio aquoso. Este gel permite a separação de compostos de forma que, inicialmente, os aniões A^{x-} da amostra, presentes na fase móvel, interagem electrostaticamente com os iões de carga oposta presentes na fase estacionária, usualmente um polímero do tipo $[RN(CH_3)_3^+OH^-]$, como demonstrado no **Esquema Reacional 1.1**.



Esquema Reacional 1.1 Interação eletrostática entre os aniões da amostra presentes na fase móvel (A^{x-}) e os grupos funcionais de amina presentes no polímero ($[RN(CH_3)_3^+OH^-]$) da fase estacionária.²³

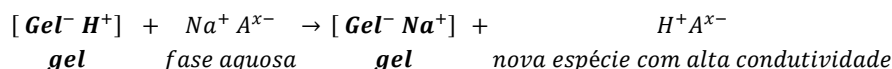
Após isto, os iões do solvente competem com os analitos aniônicos pelos grupos carregados positivamente à superfície do gel e reverterem o **Esquema Reacional 1.1**. A libertação dos aniões da amostra é realizada a diferentes velocidades, mediante a força de interação com os grupos positivos do gel, permitindo a separação dos analitos no tempo, através do processo de eluição.²³

De seguida, estes aniões migram até ao detetor. Na cromatografia de troca iónica, o detetor mais utilizado é o de condutividade, devido à sua resposta universal para iões e pelo facto de responder de forma proporcional às variações de concentração. Para além disto, são fáceis de manusear e relativamente baratos, existindo um interesse a nível industrial devido à possibilidade de miniaturização. A sua principal limitação advém da capacidade de resposta do detetor aos iões provenientes do solvente utilizado para eluir a amostra. Consequentemente, quando este detetor é utilizado, torna-se necessário um sistema de supressão que reduza a condutividade do solvente. Este sistema de supressão consiste numa coluna supressora revestida com um gel de troca iónica que converte os iões do eluente numa espécie com menos condutividade, através da troca de catiões entre o gel e o solvente, como exemplificado no **Esquema Reacional 1.2**.²³



Esquema Reacional 1.2 Exemplo da substituição de catiões presentes no gel de permuta iónica por catiões presentes no solvente de eluição e criação de uma nova espécie com baixa condutividade.²³

A supressão, para além de aumentar a sensibilidade da técnica aos iões presentes na amostra através da diminuição do ruído da linha de base, consegue ainda converter essas espécies noutras com maior condutividade, como observável no **Esquema Reacional 1.3**.



Esquema Reacional 1.3 Exemplo da conversão de espécies aniónicas em espécies com maior condutividade.²³

Para reutilizar a coluna supressora noutras análises é necessário regenerá-la através da utilização de solventes (supressão química) ou da aplicação de um potencial a dois eléctrodos, predefinido pelo operador (supressão eléctrica).

Apesar das diversas vantagens da utilização do detetor de condutividade, existem circunstâncias em que as características das técnicas espectralométricas oferecem benefícios únicos para análise. Primeiramente, atentemos no funcionamento geral de um detetor UV-Vis. Este detetor utiliza uma fonte luminosa, nomeadamente, uma lâmpada de deutério, para medições na zona ultravioleta, ou uma lâmpada de tungsténio, para medições na zona do visível. Essa fonte emite uma radiação, num comprimento de onda previamente definido pelo operador, que incide sobre o eluente que sai da coluna, e o detetor mede a sua absorção. Esta absorção corresponde à absorção da amostra, uma vez que os solventes utilizados na eluição não absorvem luz, ou absorvem muito pouco. Como apenas um número limitado de iões de baixa massa molecular consegue absorver luz e essa absorção não é uniforme em todo o espectro, a escolha do comprimento de onda oferece à técnica uma alta seletividade.²³

Os valores medidos de absorvância (ou de condutividade) pelo detetor, são convertidos em informação digital por um computador e *software* que traçam um gráfico dessas medições em função do tempo, denominado por cromatograma (**Figura 1.1**). Cada componente separado pelo sistema cromatográfico é representado no cromatograma por um pico de aspeto gaussiano

caracterizado por um tempo de retenção, que permite a sua identificação, e por uma área, que permite a sua quantificação.

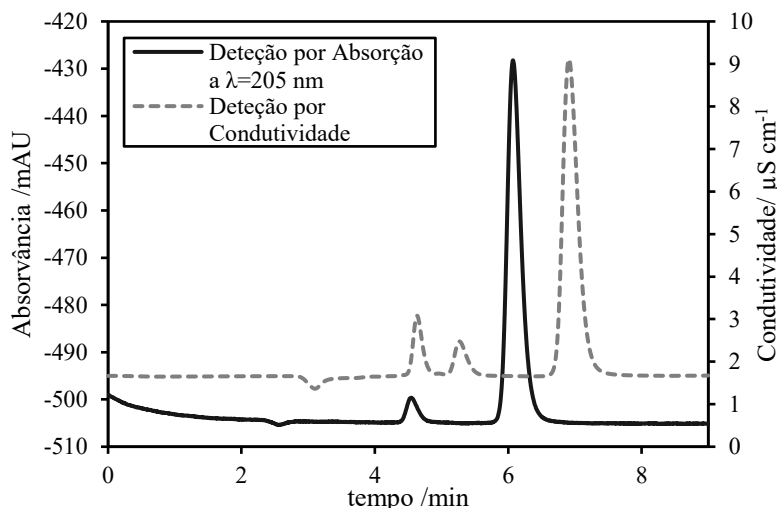


Figura 1.1 Sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma mesma solução que contém simultaneamente os iões cloreto, nitrito e nitrato. No cromatograma de deteção por condutividade, da esquerda para a direita, os picos correspondem aos iões cloreto, nitrito e nitrato. No cromatograma de deteção por UV-Vis, da esquerda para a direita, os picos correspondem aos iões nitrito e nitrato. Ambas as análises foram realizadas pelo mesmo sistema cromatográfico.

O cloreto (ião usualmente presente nas refeições), para além de ter um tempo de retenção muito semelhante ao do nitrito (**Figura 1.1**), encontra-se em concentrações muito maiores, o que poderia impossibilitar a separação entre estes componentes e, eventualmente, comprometer a análise. Neste trabalho, ao utilizarmos um comprimento de onda de 205 nm, recomendado pela norma europeia¹⁸ EN 12014-4:2005, conseguimos eliminar o interferente cloreto e detetar em simultâneo os iões nitrito e nitrato.

1.2.1.2 Confirmação da identidade de analitos numa amostra complexa

A identificação dos componentes dos cromatogramas presentes na **Figura 1.1** é evidente, considerando tratar-se de uma análise a uma solução de composição conhecida. Em amostras desconhecidas, os componentes são identificados pela comparação do seu tempo de retenção no cromatograma da amostra com o seu tempo de retenção no cromatograma de uma solução de composição conhecida, geralmente designada por calibrador ou padrão.

Na realidade, o tempo de retenção depende de diversas condições experimentais, como a velocidade do fluxo do eluente e da própria composição da amostra. Por isso, existe uma panóplia de situações em que a identificação pelo tempo de retenção não é imediata, sendo as principais causas o desempenho do sistema cromatográfico e/ou a complexidade da amostra.

Em circunstâncias onde dois analitos em estudo apresentam coeficientes de partição, K semelhantes, ou seja, o equilíbrio entre as espécies do soluto presentes na fase móvel, c_M e as espécies do soluto presentes na fase estacionária, c_S se dá a um ritmo idêntico para ambos os analitos (equação (1.1)), a sua velocidade de migração na coluna será semelhante, originando picos adjacentes com tempos de retenção próximos.²³

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad (1.1)$$

Quando os tempos de retenção de dois compostos são muito próximos e os seus picos se sobrepõem, passa a ser impossível garantir a identificação dos componentes e uma possível análise quantitativa. Nestes casos, a análise é apenas possível caso se otimizem as condições cromatográficas de modo que os picos de interesse se separem. A resolução, R_s é uma combinação

dos conceitos de seletividade e de eficiência. A seletividade, α é definida pela razão entre o coeficiente de partição do soluto B, K_B com maior afinidade para a fase estacionária, e o coeficiente de partição do soluto A, K_A como se observa na equação (1.2).²³ Essa equação pode ser simplificada, utilizando o fator de capacidade do soluto, k' até conseguirmos calcular a seletividade através de parâmetros como o tempo de retenção, t_r , tempo que o analito demora a percorrer a coluna desde o momento em que é injetado e até chegar ao detector, e o tempo morto, t_m que corresponde ao tempo em que os compostos que não são retidos na coluna demoram a chegar ao detector, imediatamente após o início da eluição. Quanto maior a seletividade, maior a separação entre os picos correspondentes aos compostos A e B.

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{\frac{t_{rB} - t_m}{t_m}}{\frac{t_{rA} - t_m}{t_m}} = \frac{t_{rB} - t_m}{t_{rA} - t_m} \quad (1.2)$$

A eficiência, N de uma coluna cromatográfica permite avaliar a capacidade da coluna em manter os picos gaussianos, independente da migração dos analitos ao longo da mesma, ou seja, a capacidade de evitar o fenômeno de alargamento das bandas para picos com tempos de retenção mais elevados. Esta eficiência é dada pela razão entre o comprimento da coluna cromatográfica, L e a altura do prato teórico, H , representada na equação (1.3). A teoria dos pratos teóricos pressupõe que o equilíbrio entre as moléculas de soluto presentes na fase estacionária e as moléculas de soluto presentes na fase móvel ocorre numa série de estágios separados, denominados por pratos teóricos. A simplicidade deste modelo levou à criação da teoria das velocidades, onde a eluição é considerada um fenômeno dinâmico e o cálculo para a altura do prato teórico é mais complexo, envolvendo a contribuição de várias componentes como o efeito do caminho múltiplo, efeito da difusão molecular longitudinal e o efeito de resistência de massa.²³

$$N = \frac{L}{H} \quad (1.3)$$

Consequentemente, a resolução, pode ser calculada através de uma fórmula simplificada, exemplificada na equação (1.4), utilizando os parâmetros de seletividade e de eficiência. Quando o valor obtido é superior a 1,5, diz-se que os compostos se encontram resolvidos. Tendo em conta toda a informação mencionada, facilmente se deduz que a alteração das condições cromatográficas pode conduzir a uma melhor separação dos componentes da amostra, nomeadamente, utilizar uma fase estacionária diferente ou alterar a composição do eluente de forma a aumentar o coeficiente de separação para o soluto B e, por consequência, aumentar a seletividade. O aprimoramento da separação é de extrema importância pois permite a determinação fiável de vários componentes.²³

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \times \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B}\right) \quad (1.4)$$

Em amostras muito complexas, a matriz apresenta uma multitude de componentes que podem interagir com os analitos em estudo, ou até mesmo com o sistema cromatográfico, provocando desvios significativos ao tempo de retenção expectável para esses analitos. Estes desvios dificultam a identificação por comparação do tempo de retenção do analito na amostra com o tempo obtido na análise de soluções padrão. O fenômeno denomina-se “efeito matriz” e, nestas circunstâncias, a forma mais eficaz de identificar um analito que apresente uma matriz desconhecida ou impossível de replicar, é através de ensaios de recuperação. Espera-se que, para além da concordância de tempo de retenção do analito na amostra com e sem adição, a diferença entre a concentração de analito obtida na análise da amostra antes e depois da adição de solução padrão, corresponda à quantidade de solução padrão adicionada. Caso isso não se verifique, não é possível proceder à identificação e quantificação. A recuperação, R é dada pela divisão do teor estimado de analito, c pelo teor esperado de analito, C como se verifica na equação (1.5).

Recomenda-se que ambas as concentrações, tanto da amostra como da amostra fortificada, estejam incluídas na gama de trabalho.

$$R (\%) = \frac{c}{C} \times 100 \quad (1.5)$$

1.2.1.3 Quantificação dos analitos presentes na amostra

Em cromatografia de troca iónica, existem gamas de concentração de analito onde se verifica que as áreas obtidas aumentam proporcionalmente com a concentração. Consequentemente, a quantidade de analito pode ser estimada através de uma função²⁴ que descreva a relação entre as áreas obtidas e a concentração de analito, denominada por curva de calibração. Para construir uma curva de calibração são necessários calibradores, ou seja, soluções com concentrações conhecidas de analito numa matriz adequada.²⁵ Essas concentrações²⁴ devem ser equidistantes e estipuladas de modo que a concentração de analito na amostra esteja incluída nessa gama. A curva de calibração pode ser mais ou menos complexa, dependendo do grau do polinómio de maior expoente da função que a define, sendo que, quando a relação entre a área e a concentração do analito é linear ou, por outras palavras, o termo quadrático é desprezável, a curva pode ser representada genericamente pela equação (1.6).

$$y = a + bx \quad (1.6)$$

Caso se utilize o método dos mínimos quadrados, a ordenada na origem, a é dada pela equação (1.7) e o declive, b pode ser determinado através da equação (1.8). As variáveis x_i e y_i representam as concentrações e sinais à i -ésima leitura de calibradores, respetivamente. \bar{x} e \bar{y} representam a média dos valores x_i e y_i . Após isto, podemos estimar a concentração do analito presente na amostra, x_a substituindo a área do seu pico y_a na equação (1.6), e resolvendo-a de forma a isolar x_a , de modo que $x_a = \frac{y_a - a}{b}$.²⁴

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (1.7)$$

$$b = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (1.8)$$

Fundamentalmente, este método visa a minimização da soma dos quadrados da diferença entre os valores experimentais, y_i e os valores do sinal instrumental, \hat{y}_i previstos pela equação da reta (1.9), designados por residuais ($y_i - \hat{y}_i$).

$$\hat{y}_i = a + bx_i \quad (1.9)$$

1.2.1.4 Validação do método instrumental de análise

O método dos mínimos quadrados pode ser aplicado desde que a incerteza associada aos calibradores seja adequadamente baixa, os dados sejam homoscedásticos e a relação entre a concentração de analito (x) e a área do pico (y) seja comprovadamente linear.²⁴ Assim, a incerteza padrão relativa dos sinais não deve ser superior a 1/3 ou 1/5 do desvio padrão relativo da razão dos sinais para todos os pares possíveis de calibradores.²⁵ Para confirmar a linearidade dos resultados é necessário avaliar os dados experimentais relativamente à presença de valores aberrantes, a homogeneidade de variâncias da resposta instrumental e a qualidade de ajuste dos dados experimentais.²⁴

A presença de valores aberrantes nos sinais replicados dos calibradores pode ser avaliada, por exemplo, pelo teste de Grubbs para valores aberrantes únicos. Este teste compara a diferença entre o menor valor medido ou o mais elevado e a média, com o desvio padrão dos resultados. Quando o valor obtido pelo teste é superior ao valor crítico tabelado para n observações e nível

de confiança escolhido, conclui-se que o valor medido é aberrante único. Porém, quando não são detetados valores aberrantes únicos, deve-se averiguar a presença de valores aberrantes emparelhados. Nesse caso, é necessário aplicar o teste de Grubbs emparelhado. Este teste consiste na determinação da redução percentual do desvio padrão que compara o desvio padrão da totalidade dos resultados com o desvio padrão excluindo as duas observações mais altas ou as duas mais baixas. Quando o valor obtido pelo teste é superior ao valor crítico para n observações e nível de confiança escolhido, admite-se a existência de valores medidos aberrantes emparelhados. Por último, salienta-se que os pontos experimentalmente obtidos não devem ser rejeitados devido, exclusivamente, a resultados de testes estatísticos sendo necessário discernimento por parte do operador.²⁴

Para a aplicação de modelos não ponderados, é essencial que a variância da resposta instrumental seja homogênea, ou seja, que os dados experimentais sejam homoscedásticos.²⁴ A homoscedasticidade pode ser confirmada recorrendo ao teste de Levene, preferido ao teste F por avaliar as variâncias em toda a gama de concentrações dos calibradores. Este teste avalia as variâncias da diferença absoluta entre cada replicado e a média. Quando o valor obtido através do teste está acima do valor crítico do teste de Fisher para $n-1$ graus de liberdade e nível de confiança escolhido, diz-se que os sinais são heteroscedásticos.²⁴⁻²⁶

Por último, avalia-se a linearidade da resposta instrumental. A linearidade pode ser avaliada através de testes estatísticos, por exemplo, pelo teste de χ^2 , que verifica se a diferença entre os pontos experimentais e os pontos obtidos pela curva de calibração pode ser explicada pela dispersão dos sinais experimentais que expressam um erro aleatório puro.^{24,27} Frequentemente, são traçados gráficos de residuais ($y_i - \hat{y}_i$) onde se observa a dispersão dos sinais replicados em torno do valor zero. Apesar de estes gráficos não permitirem uma análise quantitativa, continuam a ser amplamente utilizados devido à facilidade de interpretação visual.

1.3 Avaliação da incerteza da medição

Um operador, mesmo que inexperiente, consegue averiguar intuitivamente sobre possíveis erros cometidos durante uma medição através da sua repetição e posterior avaliação da concordância entre replicados. Mesmo sem conhecimento sobre o valor verdadeiro da sua medição e, portanto, sem capacidade de aferir sobre a exatidão dos seus resultados, esse operador, ainda que inconscientemente, ficará mais confiante nos seus resultados, caso os replicados apresentem uma pequena dispersão. Quando o grau de concordância entre os replicados é elevado, consideramos que se trata de uma medição precisa.²⁸ Apesar da confiança do operador nos resultados obtidos, é necessário quantificar propriedades do sistema que representem a qualidade desses resultados, possibilitando uma comparação objetiva com um valor de referência e/ou outros resultados. Um dos parâmetros mais utilizados para esse fim denomina-se “incerteza”, sendo definida pelo Vocabulário Internacional de Metrologia²⁹ como “um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a uma mensuranda, baseado na informação utilizada”. É consensual que, para uma dada medição, o resultado obtido deve ser reportado indicando o valor medido associado à sua incerteza e nível de confiança. Essa incerteza, denominada por incerteza expandida (U), providencia um intervalo de valores onde está contido o valor verdadeiro, x para um dado nível de confiança.²⁴

$$x \pm U$$

A avaliação da incerteza da medição requer o cumprimento de uma sequência de etapas sistematizadas pelo EURACHEM Guide “Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement”,³⁰ nomeadamente: 1ª- definição da mensuranda, 2ª- identificação de fontes de incerteza, 3ª- quantificação componentes de incerteza, 4ª- combinação dos componentes da incerteza e por último, 5ª- cálculo da incerteza expandida.

1.3.1 Definição da mensuranda

Nem todas as medições são diretas, sendo que o aumento do nível de complexidade do método analítico pode comprometer a comparação objetiva dos resultados devido a discrepâncias na caracterização da grandeza a medir entre diferentes estudos. Numa situação limite, a própria ambiguidade da caracterização pode constituir uma fonte de incerteza.³⁰ Por essa razão, quando se define a mensuranda, é necessário clarificar o objeto de análise e o parâmetro em estudo.³¹ A definição do valor medido, y deve incluir uma afirmação inequívoca e uma expressão quantitativa (1.10) que relacione os parâmetros dos quais depende, x_A , x_B e x_C também denominados por variáveis de entrada.³⁰

$$y = f(x_A, x_B, x_C) \quad (1.10)$$

A função do valor medido pode ser representada por meio de somas e subtrações, resultando em expressões lineares (1.11); ou de produtos e divisões, resultando em expressões multiplicativas (1.12), onde p , r e t representam os parâmetros que definem y e k_i as constantes associadas ao parâmetro i . Estes dois tipos de expressões podem combinar-se num valor medido.

$$y = k_p p + k_r r - k_t t \quad (1.11)$$

$$y = \frac{pr}{t} \quad (1.12)$$

1.3.2 Identificação de fontes de incerteza

Usualmente, a incerteza provém de múltiplas fontes incluindo do processo de amostragem, de interferentes e de aproximações realizadas para a execução do método analítico. Inclusive, o aumento da complexidade do método analítico pode dificultar a contabilização de todas as fontes de incerteza, apesar de nem todas contribuíram significativamente para a incerteza.³⁰

Para garantir a contabilização de todos os parâmetros é comum a elaboração de um diagrama de causa e efeito, onde um vetor horizontal principal, que representa a mensuranda, é intersetado por vetores oblíquos, denominados por ramificações, que representam fontes de incerteza, e devem incluir os parâmetros referidos na expressão quantitativa que define a mensuranda. A principal vantagem do uso deste diagrama é a simplificação do processo e posterior identificação de parâmetros repetidos, evitando a dupla contabilização.³⁰

Como a análise quantitativa é utilizada em diversas áreas de aplicação, também a escolha dos parâmetros efetivamente considerados fontes de incerteza é variada, de modo a responder às necessidades analíticas e dependendo dos dados disponíveis. Conseqüentemente, existem três abordagens principais para a identificação, quantificação e eventual combinação de fontes de incerteza, nomeadamente a *bottom up*/subanalítica – contabiliza separadamente todas as fontes de incertezas associadas a erros aleatórios e sistemáticos que diretamente afetam o desempenho das etapas do método analítico; a *top down*/supralaboratorial- utiliza resultados interlaboratoriais como forma de avaliar a incerteza para resultados intralaboratoriais; e a supra-analítica/de reconciliação- estima a incerteza com base em parâmetros de desempenho global do método analítico estimados em ambiente intralaboratorial.²⁴

1.3.3 Quantificação de fontes de incerteza

Considerando a abordagem subanalítica, as principais fontes de incerteza correspondem às variáveis de entrada na expressão quantitativa da mensuranda que, usualmente, estão relacionadas com as etapas da metodologia experimental. Para a eventual combinação dessas mesmas fontes, é necessário que estas sejam primeiramente expressas individualmente por meio de uma incerteza padrão.³⁰

Geralmente, os aparelhos e material de laboratório utilizados, nomeadamente, pipetas volumétricas, apresentam um valor nominal de uma incerteza expandida $\pm a$, sem menção do nível de confiança utilizado. Para avaliar a incerteza associada à medição, é necessário converter essa incerteza expandida, numa incerteza padrão. Caso haja razões para acreditar na ocorrência de valores extremos, ou não haja informação suficiente sobre o sistema, assume-se uma distribuição retangular e aplica-se a equação (1.13). Em situações previamente estudadas, onde não são esperados valores extremos, assume-se uma distribuição triangular em que a é dividido por $\sqrt{6}$. A situação mais comum é a utilização da distribuição retangular.³⁰

$$u = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (1.13)$$

A incerteza padrão de uma pesagem pode ser avaliada pela equação (1.14), sendo necessário conhecer a incerteza padrão associada à calibração da balança, $u_{\text{bal}}^{\text{calib}}$, que resulta da combinação da incerteza padrão associada à linearidade e sensibilidade da resposta instrumental e se encontra indicada no certificado de calibração da balança, E (equação (1.15)); e a incerteza padrão associada à repetibilidade da balança, $u_{\text{bal}}^{\text{rep}}$ obtida pelo desvio padrão de pesagens sucessivas.^{31,32}

$$u(m) = \sqrt{(u_{\text{bal}}^{\text{calib}})^2 + (u_{\text{bal}}^{\text{rep}})^2} \quad (1.14)$$

$$u_{\text{bal}}^{\text{calib}} = \frac{E}{\sqrt{3}} \quad (1.15)$$

Para avaliar a incerteza padrão associada à medição de um volume, $u(V)$ (equação (1.16)) é necessário conhecer a incerteza padrão associada ao valor nominal do material volumétrico, u_V^{calib} , a incerteza padrão associada à repetibilidade da manipulação, u_V^{rep} e a incerteza padrão associada ao efeito da temperatura u_V^T . A u_V^{calib} associada ao valor nominal do material volumétrico, t pode ser avaliada pela equação (1.17), assumindo uma distribuição retangular. A u_V^T pode ser avaliada pela equação (1.18) onde ΔT corresponde à variação de temperatura não controlada considerada e ε corresponde ao coeficiente de expansão térmica.^{31,32}

$$u(V) = \sqrt{(u_V^{\text{calib}})^2 + (u_V^{\text{rep}})^2 + (u_V^T)^2} \quad (1.16)$$

$$u_V^{\text{calib}} = \frac{t}{\sqrt{3}} \quad (1.17)$$

$$u_V^T = \frac{V \times \Delta T \times \varepsilon}{1,96} \quad (1.18)$$

1.3.4 Combinação de fontes de incerteza

Após a avaliação das incertezas referentes a medições unitárias, os valores obtidos devem ser combinados originando uma incerteza combinada que representa a incerteza associada ao valor medido. Esse valor representa uma estimativa da mensuranda, previamente definida. Posto

isto, existem vários métodos que visam a combinação de componentes de incerteza, sendo os mais frequentemente utilizados a lei da propagação de incerteza e os métodos numéricos de Kragten e de Monte Carlo. A lei de propagação de incerteza é um método algébrico e, por vezes, de avaliação morosa, que combina as incertezas padrão das variáveis de entrada resultando num valor de incerteza combinada. Por outro lado, os métodos numéricos procuram tornar exequíveis estes processos matemáticos complexos, solucionando problemas de cálculo por meio de operações aritméticas possíveis de serem aplicadas em folhas de cálculo. O método de Kragten³⁰ simplifica a lei de propagação de incerteza, aplicando o método de diferenciação numérico, e requer apenas conhecimento dos cálculos necessários para obtenção do valor medido (y). Em contrapartida, o método de Monte Carlo³⁰ combina a distribuição das variáveis de entrada resultando numa função de densidade de probabilidade do valor medido, sendo mais rigoroso que os outros métodos quando o valor medido não varia linearmente com o valor das grandezas de entradas.

1.3.4.1 Lei da propagação de incerteza

A lei de propagação de incerteza permite combinar a incerteza de várias variáveis de entrada, desde que as mesmas sejam independentes entre si e se apresentem na forma de desvio padrão ou incerteza padrão.³³ Esta combinação é efetuada através de cálculos algébricos e aplicação de fórmulas. Num método analítico complexo, onde existe uma grande quantidade de variáveis de entrada, as expressões tornam-se muito complexas e o método de avaliação acaba por ser moroso e muito suscetível a erro humano. Este método é, maioritariamente, utilizado em operações simples, em particular pesagens e diluições.

Se as variáveis de entrada x_A , x_B e x_C forem independentes, a lei da propagação de incerteza propõe que a incerteza combinada referente ao valor medido, $u_c(y)$ seja determinada através da equação (1.19), onde $\frac{\partial y}{\partial x_i}$ representa a derivada parcial de y em relação a i , e u_i representa a incerteza associada à variável i .

$$u_c(y) = \sqrt{\left(\frac{\partial y}{\partial x_A}\right)^2 u_{x_A}^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial x_B}\right)^2 u_{x_B}^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial x_C}\right)^2 u_{x_C}^2} \quad (1.19)$$

Quando as variáveis de entrada que permitem obter o valor medido têm uma relação linear entre si, $u_c(y)$ pode ser expressa pela equação (1.20).

$$u_c(y) = \sqrt{(k_p \times u_p)^2 + (k_r \times u_r)^2 + (k_t \times u_t)^2} \quad (1.20)$$

Considerando que, numa pesagem por diferença, a massa de um item, m , é calculada pela diferença entre a massa do recipiente com o item e a massa do recipiente vazio (ou tara), a incerteza de m é dada pela combinação das incertezas associadas às duas pesagens. Aplicando a lei de propagação de incertezas a esta medição, obtém-se a equação (1.21).

$$\begin{aligned} u_c(m) &= \sqrt{u(m_1)^2 + u(m_2)^2} \\ &= \sqrt{(u_{\text{bal}}^{\text{calib}})^2 + (u_{\text{bal}}^{\text{rep}})^2 + (u_{\text{bal}}^{\text{calib}})^2 + (u_{\text{bal}}^{\text{rep}})^2} \\ &= \sqrt{2(u_{\text{bal}}^{\text{calib}})^2 + 2(u_{\text{bal}}^{\text{rep}})^2} \end{aligned} \quad (1.21)$$

Quando as variáveis de entrada que permitem obter o valor medido têm uma relação multiplicativa entre si, $u_c(y)$ pode ser expressa pela equação (1.22).

$$\frac{u_c(y)}{y} = \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(r)}{r}\right)^2 + \left(\frac{u(t)}{t}\right)^2} \quad (1.22)$$

Aplicando a lei da propagação de incertezas para expressões multiplicativas e as fórmulas de avaliação da incerteza associada à medição de um volume à determinação de um fator de diluição, d , evitando a dupla contabilização da incerteza associada à temperatura, obtém-se a equação (1.23), onde V_i e V_f representam os volumes inicial e final, respetivamente, e d representa o fator de diluição V_f/V_i .

$$\frac{u_c(d)}{d} = \sqrt{\left(\frac{u(V_i)}{V_i}\right)^2 + \left(\frac{u(V_f)}{V_f}\right)^2} = \sqrt{\frac{(u_{V_i}^{\text{calib}})^2 + (u_{V_i}^{\text{rep}})^2}{V_i^2} + \frac{(u_{V_f}^{\text{calib}})^2 + (u_{V_f}^{\text{rep}})^2}{V_f^2}} \quad (1.23)$$

Podemos ainda avaliar a incerteza associada aos métodos instrumentais de análise. Combinando a incerteza associada à interpolação do sinal da amostra na curva de calibração, (u_{int}) com a incerteza associada ao valor das referências usadas na calibração do método, (u_{std}) obtemos a incerteza associada aos resultados obtidos pelo método instrumental de análise, $u(c_{\text{int}})$ (equação (1.24)). Os parâmetros c_{int} e c_{std} representam a concentração de analito na amostra estimada por interpolação inversa e a concentração de analito no calibrador, respetivamente.

$$u(c_{\text{int}}) = c_{\text{int}} \times \sqrt{\left(\frac{u_{\text{int}}}{c_{\text{int}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{std}}}{c_{\text{std}}}\right)^2} \quad (1.24)$$

Quando a calibração do método instrumental de análise recorre ao método dos mínimos quadrados, a incerteza padrão associada ao teor estimado da amostra, $u(c_a)$, é dada pela equação (1.25). O teor estimado da amostra é determinado por interpolação do sinal médio \bar{y}_a , de N sinais replicados numa curva de calibração construída com n pares ordenados (x_i, y_i) , em que x_i e y_i correspondem aos teores e sinais da réplica i ($i = 1$ a n). s_y e b correspondem ao desvio padrão residual e declive da curva de calibração, \bar{x} e \bar{y} às médias dos teores e sinais dos calibradores e u'_{std} à incerteza padrão relativa associada ao valor dos calibradores.²⁵

$$u(c_a) = \sqrt{\left(\frac{s_y}{b}\right)^2 \times \frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_a - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} + (c_a \times u'_{\text{std}})^2} \quad (1.25)$$

Através da equação (1.26) é possível obter a incerteza associada à interpolação do sinal da amostra na curva de calibração u_{int} .²⁴

$$u_{\text{int}} = \frac{s_y}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_a - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1.26)$$

O desvio padrão residual, s_y é dado pela equação (1.27), onde $(y_i - \hat{y}_i)$ representa os residuais para n resultados.²⁴

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (1.27)$$

Quando as variáveis de entrada não são independentes, ou seja, existe uma correlação entre os pares de variáveis x_i e x_k , a incerteza referente ao valor medido pode ser determinada através da equação (1.28), onde $\frac{\partial y}{\partial x_i}$ representa a derivada parcial de y em relação a i , $u(x_i)$ a incerteza padrão associada a x_i , i representa o índice de cada uma das variáveis ($i = 1$ a n) que contribui para o cálculo de y , e $u(x_i, x_k)$ a covariância entre x_i e x_k dada pela equação (1.29). r_{ik} representa o coeficiente de correlação linear entre as variáveis x_i e x_k .²⁴

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right)^2 \times u(x_i)^2 + \sum_{\substack{i,k=1 \\ i \neq k}}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right) \left(\frac{\partial y}{\partial x_k}\right) u(x_i, x_k)} \quad (1.28)$$

$$u(x_i, x_k) = u(x_i) \times u(x_k) \times r_{ik} \quad (1.29)$$

Por sua vez, o coeficiente de correlação linear de Pearson, r frequentemente utilizado como critério de avaliação da linearidade de curvas de calibração, mede o grau de correlação de duas variáveis através da equação (1.30). Os parâmetros \bar{x} e \bar{y} correspondem à média de valores de x e y . As variáveis x e y são representados pelos pares ordenados (x_i, y_i) para i leituras. Este coeficiente apresenta valores compreendidos entre -1 e 1 e, especificamente, nestes extremos, a correlação entre as variáveis é perfeitamente linear negativa e positiva, respetivamente.²⁴

$$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2] \sum_i (y_i - \bar{y})^2}} \quad (1.30)$$

1.3.4.2 Método de Monte Carlo

O método de Monte Carlo é um método estatístico de análise que simula novos resultados tendo em conta a distribuição dos valores obtidos experimentalmente. Este método numérico interpreta a incerteza da variável de entrada como uma distribuição probabilística definida por uma equação ou função e propaga-a, obtendo a incerteza da variável de saída que se apresenta como uma função de densidade de probabilidade.^{30,34,35}

O método de Monte Carlo pode ser aplicado seguindo as etapas de modelação, simulação e combinação, através de meios informáticos, como programas ou folhas de cálculo. Conhecendo a distribuição das variáveis de entrada (normal, triangular ou retangular), consegue-se simular valores para essas grandezas, em várias linhas da folha de cálculo, que são posteriormente combinadas através da expressão que define a variável de saída, ou seja, o resultado final. Calculando a média ou moda e percentis das simulações, obtém-se o resultado final associado a um intervalo de confiança. Por exemplo, o intervalo de confiança delimitado por $P_{2,5}$ e $P_{97,5}$ (P_z , percentil z ou valor acima de z % dos restantes), está associado a um nível de confiança de 95%. A função de distribuição de probabilidade do resultado final é, frequentemente, representada graficamente através de um histograma. A título de exemplo, criou-se a **Tabela 1.1** que ilustra a aplicação do método à simulação do valor medido y função das variáveis de entrada x_A , x_B e x_C .

Tabela 1.1 Representação esquemática da implementação do método de Monte Carlo para a simulação do valor medido y , função das variáveis de entrada x_A , x_B e x_C .

	x_A	x_B	x_C	Y
Simulação 1	x_{A1}	x_{B1}	x_{C1}	$y_1 = f(x_{A1}, x_{B1}, x_{C1})$
(...)	(...)	(...)	(...)	(...)
Simulação 9999	x_{A9999}	x_{B9999}	x_{C9999}	$Y_{9999} = f(x_{A9999}, x_{B9999}, x_{C9999})$
			P_{2,5}	Limite inferior do intervalo de confiança de 95%
			Média ou moda	Melhor estimativa da mensuranda
			P_{97,5}	Limite superior do intervalo de confiança de 95%

1.3.5 Cálculo da incerteza expandida

Todos os resultados devem ser expressos com um nível de confiança conhecido, possibilitando a comparação objetiva entre resultados obtidos em diferentes estudos ou até mesmo de um valor considerado como o valor real da medição. No caso da aplicação mais comum da lei da propagação de incertezas e do método de Kragten, é necessário multiplicar a incerteza padrão combinada, $u_c(y)$ por um fator de expansão k , obtendo a incerteza expandida $U = k \times u_c(y)$. O nível de confiança mais utilizado é o de 95 % sendo frequentemente determinado considerando um $k = 2$ quando as componentes de incerteza foram determinadas com um número elevado de graus de liberdade.

2 Metodologia experimental

2.1 Validação do método instrumental de análise

Para a calibração e posterior validação do método, escolheram-se intervalos de concentrações de nitrato e nitrito estimando a quantidade destes analitos consumida por refeição, com base nos valores indicados no artigo de Keller³⁶ para os hábitos de consumo alimentar em diferentes países. Os calibradores foram preparados por pesagem (METTLER TOLEDO XS205 Dual Range (máx. 81 g/ 220 g, tol. 0,01 mg/ 0,1 mg)) utilizando água ultrapura para aferir e admitindo que a densidade da água à temperatura de trabalho é de 1 g cm⁻³. A partir de uma solução padrão de nitrato com uma concentração mássica de 1000 mg L⁻¹ foi preparada uma solução mãe de concentração mássica de 20 mg L⁻¹. A partir de uma solução padrão de nitrito com uma concentração mássica de 1000 mg L⁻¹ e de uma solução padrão de cloreto com uma concentração mássica de 1001 mg L⁻¹ foi preparada uma solução mãe mista de concentração mássica de 5 mg L⁻¹ de nitrito e 5 mg L⁻¹ de cloreto. A partir destas soluções mãe foram preparados quatro calibradores mistos com diferentes concentrações mássicas de nitrato, nitrito e cloreto, nomeadamente:

- 100 µg L⁻¹ de NO₃⁻, 20 µg L⁻¹ de NO₂⁻ e 20 µg L⁻¹ Cl⁻;
- 500 µg L⁻¹ de NO₃⁻, 60 µg L⁻¹ de NO₂⁻ e 60 µg L⁻¹ Cl⁻;
- 900 µg L⁻¹ de NO₃⁻, 100 µg L⁻¹ de NO₂⁻ e 100 µg L⁻¹ Cl⁻;
- 1300 µg L⁻¹ de NO₃⁻, 140 µg L⁻¹ de NO₂⁻ e 140 µg L⁻¹ Cl⁻.

Após a preparação dos calibradores, recolheram-se, sequencialmente, para cada calibrador, sete replicados dos respetivos sinais, de modo que as segundas réplicas dos sinais dos calibradores foram obtidas depois das primeiras réplicas de todos os calibradores. Para verificar se os resultados obtidos cumprem os requisitos necessários para a aplicação do modelo linear não ponderado, recorreu-se a uma folha de cálculo²⁵ MS-Excel, devidamente validada. Resumidamente, a avaliação da incerteza dos calibradores está presente nas células BC21 a BE23 que aparecem com fundo verde e letra branca quando a incerteza padrão relativa dos sinais for menor que um terço do desvio padrão da razão dos sinais para todos os pares possíveis de calibradores, visível na **Figura 2.1**.

Ratio: s'RI/u'Rq			
Calib.\Calib.	Calib. 01	Calib. 02	Calib. 03
Calib. 01			
Calib. 02	54,55		
Calib. 03	42,84	106,49	
Calib. 04	45,61	120,43	100,26

Figura 2.1 Detalhe da folha de cálculo usada para avaliar a incerteza dos calibradores.²⁵

A **Figura 2.2** ilustra a avaliação de valores aberrantes recorrendo ao teste de Grubbs para valores únicos, identificados por células de fundo vermelho com letra branca, e emparelhados e antagonísticos, identificados por células de fundo azul com letra branca.²⁵

		Number - Single Grubbs outlier (min. three replicates)					Number - Paired Grubbs outlier (min. four replicates)				
		Replicate signals (Unit: Intensity ratio)									
	Value (mg/L)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Calib. 01	0,100851047	2,805	2,137	2,101	2,164	2,164	2,226	2,166			
Calib. 02	0,501861963	9,774	9,792	9,802	9,87	9,94	9,659	9,823			
Calib. 03	0,897165566	16,836	17,161	17,018	17,029	17,224	17,182	17,216			
Calib. 04	1,279376581	24,158	24,022	23,84	24,019	24,111	24,262	24,203			

Figura 2.2 Detalhe da folha de cálculo usada na identificação de valores aberrantes únicos, emparelhados e antagonísticos através de testes de Grubbs.²⁵

Quando se verifica a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene, a célula AE47 apresenta um fundo verde com uma mensagem em texto branco indicando que os sinais são homoscedásticos, sendo possível escolher o nível de confiança (95 % ou 99 %) na célula AO47. Quando se confirma que a resposta instrumental pode ser descrita por um modelo linear não ponderado, através do teste de χ^2 , a célula AE52 apresenta um fundo verde com uma mensagem em texto branco indicando que a regressão linear é indicada, sem necessidade de utilizar um fator de ponderação, sendo possível escolher o nível de confiança (95 % ou 99 %) na célula AO52.²⁵

Conclusion:	Signals are homoscedastic (i.e. have statistically equivalent variances)	Confidence level:	95%
Type of weighting:	No weighting		
Conclusion:	Fitted linear regression model based on weighting factor: No weighting	Confidence level:	95%

Figura 2.3 Detalhe da folha de cálculo usada para a verificação de homogeneidade de variâncias e linearidade.²⁵

Posteriormente a esta validação, e considerando a estabilidade da resposta instrumental, optou-se por proceder a uma calibração semanal recolhendo dois replicados dos sinais relativos a toda a gama de trabalho, por ordem crescente de concentrações mássicas. Ao longo da semana, esta calibração foi acompanhada pela leitura diária duplicada de dois padrões de controlo, nomeadamente, os calibradores de maior e menor concentração. Caso a diferença absoluta entre a concentração mássica do calibrador estimada pela regressão linear e a concentração mássica do calibrador seja menor que a diferença entre a incerteza da interpolação e a incerteza associada à concentração mássica do calibrador, conclui-se que o controlo está validado, como representado na **Figura 2.4**.

C#	Standard name	Reference value		Estimated value		dif	U(dif)	Controlo
		q	u(q)	q	u(q)			
C#1.1	02ABR024_C#1.1	0,124975	0,000712	0,091061	0,061371	0,033913866	0,184126	OK
C#4.1	02ABR024_C#4.1	1,290753	0,000712	1,245366	0,060782	0,045386201	0,182359	OK

Figura 2.4 Detalhe da folha de cálculo usada para a verificação de conformidade de padrões de controlo com o modelo de regressão semanal.

Após a validação do método e a aplicação de mecanismos de controlo que garantem a sua validade ao longo do tempo, como a utilização de calibrações semanais e de padrões de controlo, é possível estimar a concentração mássica de analito nas amostras (γ) por interpolação inversa ($x_a = \frac{y_a - a}{b}$), sendo que o declive e ordenada na origem da reta de calibração são dadas pelas células CE20 e CS20, e a incerteza expandida é dada para um nível de 95 % confiança, utilizando um fator de expansão $k = 2$.

2.2 Recolha de refeições

Para a realização deste trabalho foram recolhidas 50 refeições de uma cantina universitária situada em Lisboa, entre os dias 21 de março e 25 de julho de 2024. Tendo em conta o horário e funcionamento da cantina, bem como o tempo necessário para efetuar a extração e análise, recolheu-se apenas uma amostra por dia. As refeições foram adquiridas através do sistema de *takeaway* da cantina escolar em estudo. Os componentes “sopa”, “prato principal” e “salada”

foram transportados, separadamente, em três recipientes de plástico de uso doméstico. O componente “sobremesa” (fruta ou iogurte) foi transportado sem recipiente.

2.3 Procedimento de extração de analitos

No laboratório, a massa dos constituintes da refeição foi determinada pela diferença de massa do recipiente contendo o constituinte e do recipiente vazio (Mettler Toledo PB303-S (máx. 310 g; tol: 0,001 g)). A massa da refeição é determinada pela soma da massa dos seus vários componentes. Antes da pesagem foram retirados ossos, espinhas e caroços. Após homogeneização dos componentes (BECKEN Table blender BTB50207 1000 W), são retirados 10 g de amostra aos quais se adicionam 50 mL de água ultrapura (MilliQ-academic 18,2 MΩ cm) a uma temperatura entre 50 °C e 60 °C e procede-se à agitação magnética (RsLab-11C) a 1400 rpm durante 10 minutos. O sistema é filtrado a vácuo (Filter-LAB 1300/80 110 mm e Filter Papers Whatman® 150 mm) e do extrato resultante são retirados 10 mL para um balão volumétrico de 200 mL onde são adicionados 50 mL de acetonitrilo (CHEM-LAB HPLC grade 99,9+%, Honeywell Riedel-de-Haën CHROMASOLV™ HPLC >99,9% e PanReac AppliChem HPLC) e acertado com água ultrapura. Em ambas as medições são utilizadas pipetas volumétricas, tipo A. A amostra diluída foi centrifugada (OHANUS Frontier™ 5706) a 5000 rpm durante 5 minutos e novamente filtrada recorrendo a filtros cromatográficos (Filtro de seringa PTFE hidrofóbico 0,45 µm). Para que fosse possível analisar o extrato posteriormente ao dia de extração, recolheu-se a amostra filtrada (após os filtros cromatográficos) para frascos opacos de 10 mL ou 25 mL que ficaram armazenados num frigorífico à temperatura de 4 °C. A massa de refeição não utilizada foi colocada em sacos de compostagem.

2.4 Procedimento de análise por cromatografia de troca iónica

A análise dos aniões em estudo foi realizada num cromatógrafo iónico (881 Compact IC PRO Metrohm®) com uma pré-coluna Dionex IonPac™ AG14 4×50 mm e uma coluna Dionex IonPac™ AS14 4×250 mm, utilizando um *loop* de 100 µL e um fluxo de 0,8 mL min⁻¹ de eluente para aniões composto por um tampão com 3,5 mM Na₂CO₃ e 1,0 mM NaHCO₃. Ao cromatógrafo encontra-se acoplado um detetor UV-Vis (887 Professional UV-vis Detector Metrohm®) sendo a deteção realizada a 205 nm. O *software* utilizado foi o MagicNet 2.3 da Metrohm®.

2.5 Ensaios de recuperação

Os ensaios de recuperação permitem perceber se as análises cromatográficas são afetadas por efeitos de matriz relevantes, nomeadamente verificar como a composição da matriz afeta o tempo de retenção dos analitos.

Os ensaios de recuperação foram preparados considerando soluções constituídas pela mistura de quantidades variáveis de extrato de refeição e de calibrador, explicitados na **Tabela 2.1**. Estes ensaios foram preparados por pesagem (METTLER TOLEDO XS205 Dual Range), utilizando pipetas de Pasteur descartáveis para as pesagens da refeição e calibrador, posteriormente acertados para uma massa total de 10 g utilizando água ultrapura. No total, foram realizados nove ensaios de recuperação para refeições recolhidas nos meses de abril e junho. À exceção da refeição recolhida a 24 de abril, para a qual foram realizados 2 ensaios, realizou-se somente um ensaio de recuperação por refeição.

Tabela 2.1 Parâmetros de preparação de ensaios de recuperação de analito realizados para refeições recolhidas nos meses de abril e junho. γ - concentração mássica de analito no calibrador, m_e , m_c e m_t - massas de calibrador, de extrato e total, respetivamente, utilizadas para cada ensaio.

$\gamma/\mu\text{g L}^{-1}$					
Refeição	Nitrato	Nitrito	m_e/g	m_c/g	m_t/g
02 de abril de 2024	1300	140	3	5	10
03 de abril de 2024	1300	140	3	5	10
04 de abril de 2024	1300	140	3	5	10
10 de abril de 2024	1300	140	2	5	10
24 de abril de 2024	1300	140	2	5	10
24 de abril de 2024 ii	900	100	4	5	10
29 de abril de 2024	900	100	3	5	10
03 de junho de 2024	1300	140	3	5	10
07 de junho de 2024	1300	140	2	6	10

A recuperação analítica de analito adicionado ao extrato de refeição, R reflete a quantidade de analito recuperada no processo, face à quantidade presente na amostra e é calculada pela equação (2.1), onde m_e , m_c e m_a representam a massa de extrato, calibrador e água ultrapura, γ_F e γ_A representam as concentrações mássicas da amostra fortificada e da amostra obtidas por interpolação da curva de calibração, respetivamente, e γ_C a concentração mássica do calibrador.

$$R = \frac{(m_e + m_c + m_a) \times \gamma_F - \gamma_A \times m_e}{\gamma_C \times m_c} \quad (2.1)$$

A incerteza padrão associada à recuperação, $u(R)$ é dada pela equação (2.2), onde $\frac{\partial R}{\partial i}$ representa a derivada parcial de R em relação à variável de entrada i , $u(i)$ a incerteza padrão associada à variável de entrada i . As equações (2.3) a (2.8) representam o desenvolvimento das diversas derivadas parciais presentes na equação (2.2).

$$u(R) = \sqrt{\left(\frac{\partial R}{\partial m_e}\right)^2 \times u(m_e)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial m_c}\right)^2 \times u(m_c)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial m_a}\right)^2 \times u(m_a)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial \gamma_F}\right)^2 \times u(\gamma_F)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial \gamma_A}\right)^2 \times u(\gamma_A)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial \gamma_C}\right)^2 \times u(\gamma_C)^2} \quad (2.2)$$

$$\left(\frac{\partial R}{\partial m_e}\right) = \frac{\gamma_F - \gamma_A}{\gamma_C \times m_c} \quad (2.3) \quad \left(\frac{\partial R}{\partial m_c}\right) = \frac{\gamma_F - \gamma_C \times R}{\gamma_C \times m_c} \quad (2.4) \quad \left(\frac{\partial R}{\partial m_a}\right) = \frac{\gamma_F}{\gamma_C \times m_c} \quad (2.5)$$

$$\left(\frac{\partial R}{\partial \gamma_F}\right) = \frac{m_e + m_c + m_a}{\gamma_C \times m_c} \quad (2.6) \quad \left(\frac{\partial R}{\partial \gamma_A}\right) = \frac{-m_e}{\gamma_C \times m_c} \quad (2.7) \quad \left(\frac{\partial R}{\partial \gamma_C}\right) = \frac{-R}{\gamma_C} \quad (2.8)$$

Considera-se como recuperação ideal, uma recuperação de 100 % (ou 1) em que a diferença absoluta entre 1 e a recuperação é menor ou igual à incerteza expandida desta diferença (equação (2.9)). Para estes cálculos considerou-se que as soluções têm densidades equivalentes.

$$|1 - R| \leq 2 \times u(R) \quad (2.9)$$

2.6 Avaliação de risco

A avaliação do risco de exposição dos utentes da cantina aos analitos pressupõe o conhecimento da quantidade de analito ingerida por refeição por peso corporal. Esta pode ser estimada multiplicando a fração mássica de nitrato na refeição, w_i pela massa da refeição, m_i e dividindo pelo peso corporal do consumidor, p . Para que este valor fosse comparável com a dose

diária admissível estabelecida por lei, considerou-se que, diariamente, se fazem duas refeições – almoço e jantar- sendo a quantidade diária de analito ingerida por peso corporal de consumidor, QI estimada pelo somatório das quantidades ingeridas nessas refeições (equação (2.10)). Para avaliar a respetiva incerteza e determinar o risco de exposição de utentes da cantina ao analito por ingestão de refeições, utilizou-se uma nova folha de cálculo MS-Excel que executa o método de Monte Carlo.

$$QI = \sum_{i=1}^2 \frac{w_i \times m_i}{p} \quad (2.10)$$

No total, realizaram-se 9999 simulações e em cada uma, simularam-se os parâmetros: peso do consumidor, massa da refeição e fração mássica de analito na refeição. Por cada simulação, manteve-se constante o peso do consumidor e considerou-se o consumo de duas refeições com o objetivo de se obter um valor representativo de uma ingestão diária (Figura 2.5).

Trial	Individual weight	Meal weight		w		Meal weight		w		mg/kg bw	Daily Ingestion mg/kg / bw		
		Meal Code	Weight (g)	Meal Code	Simul.	w (mg/kg)	Meal Code	Weight (g)	Meal Code			Simul.	w (mg/kg)
1	76	37	830	38	7770	12	18	849	18	5198	76	0,13	0,97
2	55	13	695	26	1246	80	2	758	28	7341	68	1,02	1,97

Figura 2.5 Detalhe da folha de cálculo usada para execução do método Monte Carlo para avaliar o risco de exposição ao analito por ingestão de duas refeições da cantina.

O peso do consumidor foi simulado pelo inverso da distribuição cumulativa normal utilizando a fórmula do MS-Excel =INV.NORMAL(Probabilidade; Média; Desvio Padrão), considerando uma probabilidade aleatória através da função ALEATÓRIO(), um valor médio de 65 kg e um desvio padrão de 10 %.

O peso da refeição foi simulado pelo inverso da distribuição cumulativa normal utilizando a fórmula do MS-Excel, considerando o peso da refeição e a sua incerteza como média e desvio padrão, respetivamente. Para cada simulação, as duas refeições diariamente consumidas foram escolhidas aleatoriamente, através da função ALEATÓRIOENTRE(1; N), onde N representa o número total de refeições analisadas. A massa de cada refeição, m_r foi calculada pela soma da massa dos componentes da refeição (m_i), que por sua vez é calculada pela diferença de massas entre o recipiente de transporte com o componente (m_x) e o recipiente vazio (m_{x_0}), através da equação (2.11), e a incerteza foi calculada conforme as equações descritas no tópico **Avaliação da incerteza da medição**.

$$m_r = \sum m_i = \sum (m_x - m_{x_0}) \quad (2.11)$$

A título de exemplo, consideremos as massas obtidas nas pesagens dos diversos componentes da refeição recolhida a 08 de julho de 2024, apresentadas na **Tabela 2.2**.

Tabela 2.2 Massas referentes às pesagens dos diferentes componentes da refeição recolhida a 08 de julho de 2024.

x =	Sopa i	Sopa ii	Carne	Puré	Salada	Banana
m_x /g	196,852	149,780	244,910	278,365	82,014	134,827
m_{x_0} /g	26,352	48,702	50,460	50,391	40,629	40,516

Temos que a massa total da refeição é dada por:

$$m_r = (196,852 - 26,352) + (149,780 - 48,702) + (244,910 - 50,460) + (278,365 - 50,391) + (82,014 - 40,629) + (134,827 - 40,516) = 829,698 \text{ g}$$

A incerteza associada a uma pesagem única, realizada sobre o prato de balança vazio, é dada por:

$$u(m) = \sqrt{\left(\frac{0,005}{\sqrt{3}}\right)^2 + (0,000663325)^2} = 0,00296 \text{ g}$$

A incerteza associada à massa de um componente x , determinada numa pesagem por diferença, é dada por:

$$u_c(m_i) = \sqrt{2 \times \left(\frac{0,005}{\sqrt{3}}\right)^2 + 2 \times (0,000663325)^2} = 0,004188874 \text{ g}$$

Desta forma, o componente “Sopa i” tem uma massa de 170,500 g com uma incerteza padrão de 0,004 g.

A incerteza associada à massa da refeição é dada por:

$$u_c(r) = \sqrt{\sum u_c(m_i)^2} = 0,010260604 \text{ g}$$

Concluindo, a refeição recolhida a 08 de julho de 2024 pesa 829,698 g com uma incerteza padrão combinada de 0,010 g.

A fração mássica de analito, w foi selecionada utilizando a fórmula do MS-Excel **ÍNDICE(Matriz; N.º. da linha; N.º. da coluna)**, sendo que a matriz corresponde a 9999 simulações do valor de w por refeição (**Figura 2.6**), em que o número da linha é escolhido pela função **=ALEATÓRIOENTRE(1;M)**, onde M representa o número total de simulações, e o número da coluna corresponde à refeição escolhida aleatoriamente através da função **ALEATÓRIOENTRE(1; N)**, onde N representa o número total de refeições analisadas.

	20MAR024		25MAR024			01ABR024				08ABR024				
Simul.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	24,750595	61,716601	41,030892	42,535943	43,415582	69,257046	21,551968	74,367192	51,345964	10,48225	85,66214	89,93288	121,7758	91,36669
2	29,605828	65,98368	41,31507	43,474911	43,315068	81,023415	34,267188	84,175013	60,748542	1,763829	79,09068	83,24512	114,4505	85,00629
3	25,656034	63,161958	37,263142	36,897764	39,305648	78,327057	31,901843	82,927965	58,918437	#VALOR!	72,64658	77,01468	107,5815	78,2113
4	23,87674	61,01449	38,909436	39,163831	40,919735	66,67439	19,311049	72,775228	49,81784	3,780217	81,29216	85,04514	116,5419	85,7961

Figura 2.6 Detalhe da folha de cálculo onde se encontram compiladas todas as simulações da fração mássica de analito na refeição, w .

A fração mássica de analito na refeição é dada pela equação (2.12), onde γ corresponde à concentração mássica de analito no extrato, m à massa da alíquota e V_1 , V_2 e V_3 ao volume de água utilizada no processo de extração, ao volume de solução amostra de 10 mL e ao volume total de extrato diluído, respetivamente. Cada valor de w é calculado simulando as variáveis de entrada V_1 , V_2 , V_3 e m através da fórmula do MS-Excel **=INV.NORMAL(Probabilidade; Média; Desvio Padrão)**, considerando uma probabilidade aleatória através da função **ALEATÓRIO()**, a média e a incerteza padrão de cada variável.

$$w = \frac{\gamma \times V_1 \times V_3}{m \times V_2} \quad (2.12)$$

Neste segmento do trabalho entendeu-se que, como os parâmetros que definem a regressão linear variam com a calibração semanal, seria necessário efetuar 9999 simulações de γ por refeição analisada, considerando o coeficiente de Pearson, de modo a assegurar alguma correlação de estimativas. Este coeficiente foi determinado pela correlação dos sinais replicados dos calibradores obtidos durante a calibração semanal. Estas simulações foram feitas aplicando a decomposição de Cholesky, considerando uma distribuição *t-student* de uma cauda para 25 graus de liberdade.

Após a obtenção de todos os parâmetros necessários, calculou-se, para cada uma das 9999 simulações, a quantidade diária ingerida de analito, QI . A função de densidade de probabilidade

referente a QI foi representada por um histograma de 50 classes com uma amplitude de $(QI_{\text{máximo}} - QI_{\text{mínimo}})/50$.

2.7 Alterações ao protocolo experimental

2.7.1 Contribuição dos acompanhamentos hortícolas para a concentração de analito

Numa continuação do estudo do sistema, decidiu-se explorar potenciais fontes dos analitos em estudo, procedendo-se a uma alteração no processo de extração de quatro refeições. Nestes casos, a refeição foi triturada sem o componente “salada” sendo retirada uma alíquota de 10 g (Mettler Toledo PB303-S) dessa mistura. Depois, adicionou-se a salada e sujeitou-se o sistema novamente ao processo de trituração, tendo sido retirada uma alíquota de 10 g da mistura final. Ambas as alíquotas foram sujeitas ao processo de extração e análise descritos nas secções anteriores. Considera-se por componente “salada” qualquer acompanhamento constituído exclusivamente por produtos hortícolas (**Tabela 2.3**). A fração mássica de analito na refeição, w com e sem “salada” foi calculada conforme a equação (2.12) e a sua incerteza é dada pela equação (2.13).

Tabela 2.3 Descrição qualitativa do componente “salada” para as refeições sujeitas à alteração acima referida no procedimento experimental.

Refeição	Componente “salada”
09 abril de 2024	Alface
30 abril de 2024	Mistura de alfaces
13 maio de 2024	Grelos salteados
06 junho de 2024	Alface e cenoura

$$u_c(w) = w \times \sqrt{\left(\frac{u(\gamma)}{\gamma}\right)^2 + \left(\frac{u(V_1)}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{u(V_3)}{V_3}\right)^2 + \left(\frac{u(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u(V_2)}{V_2}\right)^2} \quad (2.13)$$

2.7.2 Contribuição de cada componente da refeição para a concentração de analito

Com a intenção de aprofundar o conhecimento sobre a contribuição dos vários componentes de uma refeição para a fração mássica de analito na refeição, optou-se por alterar o procedimento experimental para a refeição recolhida a 02 de maio de 2024. O processo de trituração foi alterado, de forma a considerar a remoção e análise de alíquotas de 10 g (Mettler Toledo PB303-S) contendo várias misturas de componentes da refeição. Assim, após a trituração do componente “sopa” e de se ter retirado uma alíquota de 10 g, adicionou-se o componente “salada”, e a mistura foi novamente triturada e no final retirada uma nova alíquota de 10 g. Este processo foi repetido, sequencialmente, até todos os componentes terem sido adicionados e a última alíquota conter todos os componentes da refeição completa. Os componentes i foram adicionados pela seguinte ordem: 1) sopa (de alho francês), 2) salada (mistura de alfaces), 3) sobremesa (pêra), prato principal separado em 4) carne (frango à passarinho), 5) batata e 6) arroz. Admitindo um total de seis componentes, foram retiradas seis alíquotas, de tal modo que, a alíquota referente ao primeiro componente adicionado A com uma massa m_1 , produziu um extrato de concentração mássica γ_1 e tinha uma fração mássica w_A . A segunda alíquota, retirada após a adição do segundo componente B, apresentou uma massa m_2 associada a uma concentração

mássica de analito no extrato γ_2 e uma fração mássica w_{AB} , considerando os componentes A e B presentes na mistura. A fração mássica do componente A é dada pela equação (2.14) e a da mistura dos componentes A e B é dada pela equação (2.15). Considerando as massas das alíquotas retiradas após trituração do primeiro componente e trituração da mistura dos componentes A e B (m_1 e m_2) e as massas dos componentes A e B (m_A e m_B), determinou-se a fração mássica de analito no componente B (w_B) pela equação (2.16). As frações mássicas dos restantes componentes adicionados cumulativamente foram determinadas de forma equivalente.

$$w_A = \frac{\gamma_1 \times V_1 \times V_3}{m_1 \times V_2} \quad (2.14)$$

$$w_{AB} = \frac{\gamma_2 \times V_1 \times V_3}{m_2 \times V_2} \quad (2.15)$$

$$w_{AB} = w_A \left[\frac{(m_A - m_1)}{m_A - m_1 + m_B} \right] + w_B \left[\frac{m_B}{m_A - m_1 + m_B} \right] \quad (2.16)$$

$$\Leftrightarrow w_B = \frac{w_{AB}(m_A - m_1 + m_B) - w_A(m_A - m_1)}{m_B}$$

Neste segmento do trabalho, utilizou-se o método Monte Carlo para obter 9999 simulações de w_B .

A fração mássica da mistura de componentes w_{AB} foi simulada considerando as variáveis de entrada da equação (2.15) de modo que V_1 , V_2 e V_3 foram simulados utilizando a função da fórmula do MS-Excel =INV.NORMAL(Probabilidade; Média; Desvio Padrão), considerando uma probabilidade aleatória, o volume medido e a incerteza padrão associada a cada volume. As massas das alíquotas ($m_i, i=1,2,3,\dots,6$) foram simuladas pela mesma fórmula, mas os seus valores foram mantidos constantes por cada simulação. De modo a simular γ , entendeu-se que, como os parâmetros que definem a regressão linear variam com a calibração semanal, seria necessário efetuar 9999 simulações de γ por componente ou mistura de componentes analisadas, considerando o coeficiente de Pearson, de modo a assegurar alguma correlação de estimativas. Este coeficiente foi determinado pela correlação dos sinais replicados dos calibradores obtidos durante a calibração semanal. Estas simulações foram feitas aplicando a decomposição de Cholesky, considerando uma distribuição *t-student* de uma cauda para 36 graus de liberdade.

As massas dos componentes foram simuladas pela função do MS-Excel =INV.NORMAL(Probabilidade; Média; Desvio Padrão), considerando uma probabilidade aleatória, a massa dos componentes e a incerteza padrão associada a essa massa. Salienta-se que estes valores de massa não variavam para a mesma simulação.

3 Apresentação e discussão de resultados

3.1 Validação do método instrumental de análise de nitrito e de nitrato

A análise dos sete sinais replicados de cada um dos quatro calibradores permitiu concluir, para o analito nitrito, que o método dos mínimos quadrados era adequado para descrever a resposta instrumental, visto que verificou todas as condições necessárias, nomeadamente, a incerteza dos calibradores é adequadamente baixa; não existem valores aberrantes ($nc = 99\%$) de acordo com o teste de Grubbs para valores únicos ou emparelhados; os sinais são homoscedásticos ($W = 1,4 < W_{crit} = 4,7$, $nc = 99\%$) de acordo com o teste de Levene. Por último, verificou-se que a resposta instrumental tem tendência linear ($F_{cal} = 1,4 < F_{tab} = 5,6$, $nc = 99\%$) de acordo com o teste de χ^2 . A dispersão da diferença do sinal instrumental experimental e do sinal previsto pela reta de calibração referente ao nitrito encontra-se representada na **Figura 3.1**.

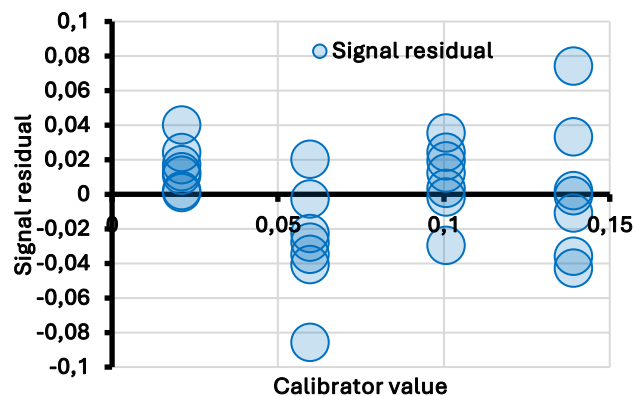


Figura 3.1 Gráfico de resíduos obtido em função dos sinais instrumentais dos calibradores para a determinação de nitrito.

A análise dos sete sinais replicados de cada um dos quatro calibradores permitiu concluir, para o analito nitrato, que a incerteza dos calibradores é adequadamente baixa. Para o calibrador de menor concentração, a primeira réplica é considerada um valor aberrante ($nc = 99\%$), pelo teste de Grubbs para valores únicos, e a terceira e sexta réplicas são consideradas como valores aberrantes ($nc = 99\%$), pelo teste de Grubbs para valores emparelhados. Contudo, devido ao número reduzido de replicados, estes valores não foram excluídos, sendo todos estes sinais considerados homoscedásticos ($W = 1 < W_{crit} = 3$, $nc = 95\%$), de acordo com o teste de Levene. Por último, verificou-se que a resposta instrumental tem tendência linear ($F_{cal} = 1,6 < F_{tab} = 3,4$, $nc = 99\%$) de acordo com o teste de χ^2 . Desta forma, considerou-se adequada a utilização do método dos mínimos quadrados para descrever a resposta instrumental. A dispersão da diferença do sinal instrumental experimental e do sinal previsto pela reta de calibração referente ao nitrato encontra-se representada na **Figura 3.2**.

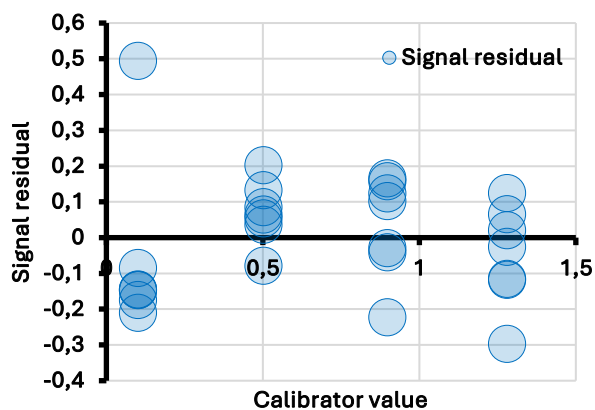


Figura 3.2 Gráfico de resíduos obtido em função dos sinais instrumentais dos calibradores para a determinação de nitrato.

3.2 Análise de cromatogramas de refeições

Os cromatogramas obtidos para a análise de refeições apresentaram uma complexidade elevada, com a presença de oito picos principais aos 3,3; 4,3; 5; 5,5; 7,3; 9,3; 11 e 12 minutos. Apesar da diversidade dos componentes das refeições analisadas, os cromatogramas apresentam um perfil semelhante (**Figura 3.3**).

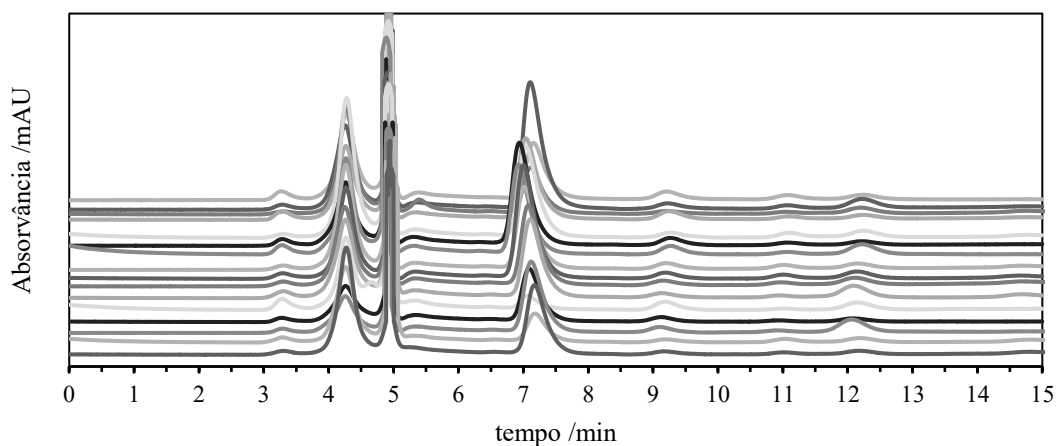


Figura 3.3 Cromatogramas obtidos por análise das refeições recolhidas no mês de abril nas condições cromatográficas mencionadas em 2.4.

Para identificar os analitos nitrito e nitrato no cromatograma da amostra é necessário comparar os tempos de retenção entre os picos da amostra e os do calibrador misto (**Figura 3.4**). No calibrador, o pico do nitrito aparece aos 5,6 minutos, não existindo nenhum pico definido no cromatograma da amostra com um tempo de retenção semelhante. O tempo de retenção do nitrato no cromatograma do calibrador é de aproximadamente 7,4 minutos, semelhante ao pico da amostra aos 7,1 minutos, o que é um forte indicador sobre a sua identidade, salvaguardando a possibilidade de ser um outro analito com tempo de retenção semelhante. Assim sendo, não é possível concluir, preliminarmente, sobre a identidade de qualquer um dos picos suspeitos.

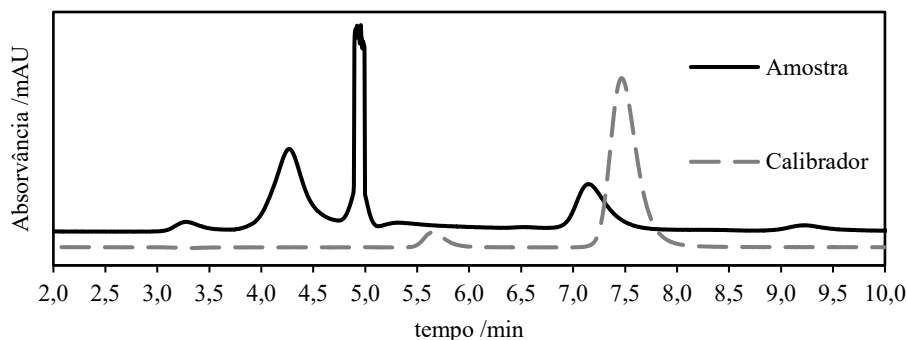


Figura 3.4 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise do calibrador mais concentrado e da amostra recolhida a 26 de março de 2024 nas condições cromatográficas mencionadas em 2.4.

A elevada complexidade do cromatograma tornou necessário um conhecimento mais aprofundado do sistema. Comparando os iões mais comuns em produtos alimentares que absorvem a um comprimento de onda de 205 nm com os reagentes presentes no laboratório, preparam-se fortificações qualitativas da amostra com os iões acetato (**Figura 3.5a**), ascorbato (**Figura 3.5b**) e brometo (**Figura 3.5c**). Os resultados das fortificações demonstram o aumento da absorvância em apenas um pico com tempo de retenção aproximado ao obtido pela análise do ião isolado. Para os iões acetato e ascorbato, este pico já existia no cromatograma da refeição podendo estes iões ser responsáveis pelos picos a 4,3 e 5 minutos, respetivamente. Comparando o cromatograma da refeição inicial com o cromatograma da refeição depois da fortificação com o ião brometo, observa-se um novo pico aos 6 minutos que aparenta ter uma lomba com um perfil semelhante ao pico com tempo de retenção 6,8 minutos. Desta forma, a situação mais provável é que, nas refeições estudadas, o brometo não exista ou esteja numa quantidade abaixo do limite de deteção.

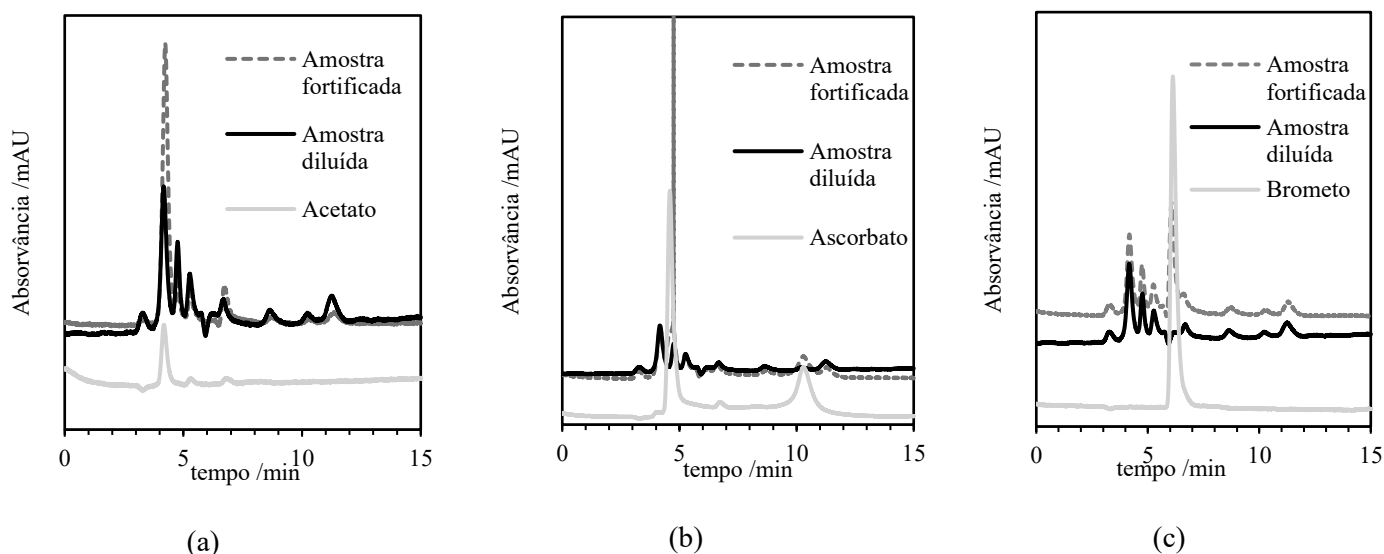


Figura 3.5 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise da amostra recolhida a 18 julho de 2024 e posteriores diluições e fortificações com os iões acetato (a), ascorbato (b) e brometo (c). Os cromatogramas foram obtidos nas condições de 2.4.

Após esta análise preliminar, não foi possível identificar outros analitos que tivessem um tempo de retenção semelhante ao do nitrito e pudessem atuar como interferentes. No caso do nitrato, apenas o brometo apresentou um tempo de retenção semelhante.

3.3 Nitrito

Em vários cromatogramas de diferentes refeições apareceu um pico aos 5,3 minutos e para confirmar se esse pico correspondia ao nitrito realizou-se uma análise mais detalhada.

Várias refeições foram sujeitas a diluições e os resultados foram semelhantes para as diferentes análises. A título de exemplo, consideremos os cromatogramas obtidos na análise da refeição recolhida a 26 de março de 2024 (**Figura 3.6**) que representam a amostra diluída e respetivas fortificações a concentrações crescentes de calibrador (I e II), bem como a amostra sem diluição. O cromatograma do calibrador utilizado foi incluído para facilitar a comparação entre o pico do nitrito a aproximadamente 5,6 minutos com o pico de interesse na amostra a 5,4 minutos. Na amostra diluída, o pico de interesse apresenta uma absorvância baixa, quase indistinguível da linha de base. Para verificar o impacto do efeito de matriz no tempo de retenção do nitrito, fortificou-se a amostra diluída utilizando um calibrador misto da qual resultou, relativamente ao nitrito, um pico bem definido a um tempo de retenção ligeiramente mais elevado que o pico suspeito. Este deslocamento é também observável para o pico do nitrato aos 7,5 minutos o que, preliminarmente, reforça a hipótese que o pico suspeito possa corresponder ao nitrito e que a deformação provém da baixa resolução relativamente ao pico adjacente aos 5 minutos.

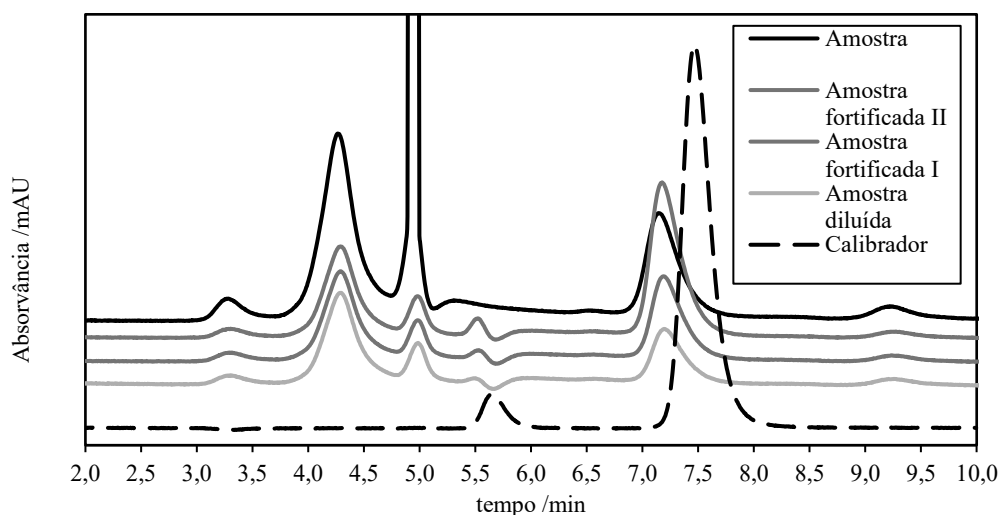


Figura 3.6 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de diluições e fortificações do extrato da refeição de 26 de março de 2024. Os cromatogramas foram obtidos nas condições cromatográficas de 2.4.

Suspeitando da existência de um pico mal definido e de baixa resolução com um tempo de retenção semelhante ao do nitrito, recorreu-se a ensaios de recuperação, para confirmar a identidade do mesmo. No total, foram preparadas nove fortificações, com diferentes fatores de diluição e com diferentes concentrações de calibradores adicionadas, descritas na secção 2.5. A título de exemplo, consideremos a análise da refeição recolhida a 02 de abril de 2024. A sobreposição dos cromatogramas da amostra e da amostra diluída (**Figura 3.7**) mostra uma lombagem, a um tempo de retenção semelhante ao do nitrito presente na amostra fortificada e no calibrador, aos 5,5 minutos.

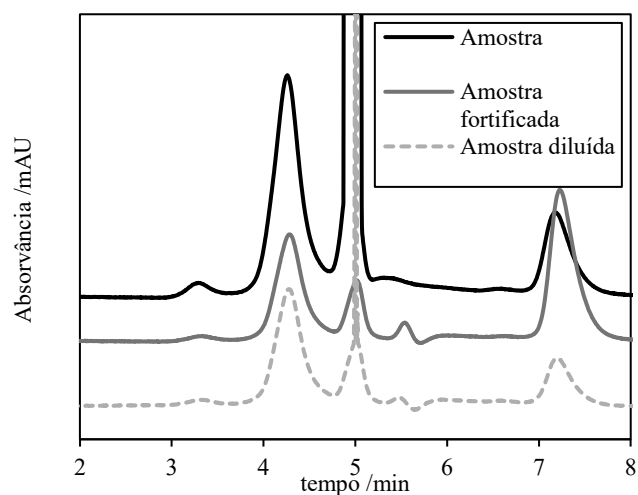


Figura 3.7 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise da diluição 1:2 e da fortificação do extrato da refeição de 02 de abril de 2024. Os cromatogramas foram obtidos nas condições cromatográficas de 2.4.

A amostra e a amostra fortificada foram analisadas no cromatógrafo em duplicado. Pela análise cromatográfica da amostra, o *software* não conseguiu identificar o pico deformado que se suspeita ser o do nitrito a 5,3 minutos, pelo que foi considerado um valor de área de zero. Pela análise cromatográfica da amostra fortificada, foram obtidas as áreas de 0,748 mAu×min e 0,741 mAu×min para o pico aos 5,5 minutos. A concentração mássica de nitrito no extrato, γ foi estimada pela interpolação inversa destas áreas ($x_a = \frac{y_a - a}{b}$) na reta de calibração obtida para a semana de 01 a 05 de abril de 2024 ($y = 11,6x + 0,01$). Na **Tabela 3.1** encontram-se compilados todos estes dados.

Tabela 3.1 Áreas e tempos de retenção relativos ao nitrito obtidos pela análise cromatográfica, em duplicado, da amostra e da amostra fortificada e concentração mássica estimada pela folha de cálculo, conforme mencionado em 2.1.

	Amostra		Amostra fortificada	
	i	ii	i	ii
$A_{NO_2^-}$ /mAU×min	-	-	0,748	0,741
$t_{rNO_2^-}$ /min	-	-	5,54	5,54
γ /mg L ⁻¹	-		(0,06 ± 0,03) (nc = 95 %, k = 2)	

Obteve-se uma recuperação de $(1,66 \pm 0,86)$ (nc = 95 %, $k = 2$), através das equações (2.1) e (2.2). Pelo critério de aceitação descrito na equação (2.9), este ensaio permite identificar o pico presente aos 5,5 minutos no cromatograma da amostra fortificada como nitrito. Tendo em conta que não existe analito nativo na amostra ou que este não pode ser quantificado, podemos concluir que o nitrito presente na amostra fortificada provém exclusivamente do calibrador adicionado.

Consideremos um outro ensaio de recuperação, realizado para a refeição recolhida a 03 de junho de 2024. O cromatograma da amostra (**Figura 3.8**) apresenta um pico bem definido e de área determinável aos 5,5 minutos, tornando-o suspeito de ser nitrito. Pela interpolação da reta de calibração dessa semana ($y = 12,8x - 0,08$), a concentração mássica de nitrito na amostra e na amostra fortificada é de $(0,351 \pm 0,050)$ mg L⁻¹ (nc = 95 %, $k = 2$) e $(0,133 \pm 0,020)$ mg L⁻¹ (nc = 95 %, $k = 2$), respetivamente. A recuperação obtida é de $(-0,96 \pm 0,74)$ (nc = 95 %, $k = 2$), pelo que, o critério de aceitação não é cumprido. Consequentemente, o pico presente aos 5,5 minutos no cromatograma da amostra não pode ser identificado como nitrito.

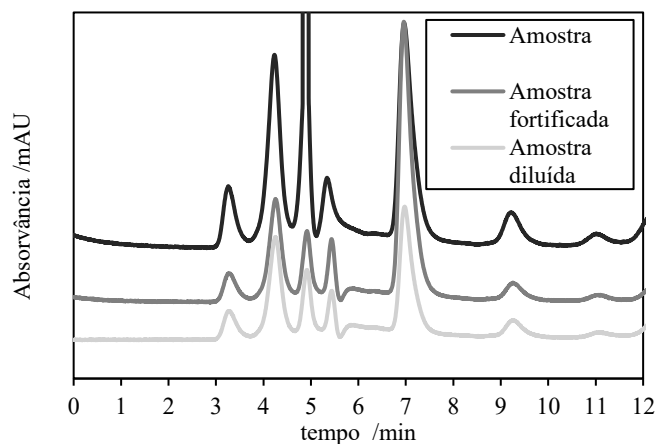


Figura 3.8 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise da diluição e fortificação do extrato da refeição de 03 de junho de 2024. Os cromatogramas foram obtidos nas condições cromatográficas de 2.4.

Com exceção do ensaio de recuperação realizado para a refeição recolhida a 02 de abril, nenhum dos restantes ensaios (**Tabela 3.2**) verifica o critério de aceitação pelo que não se pode concluir sobre a presença de nitrito nas refeições e, conseqüentemente, não é possível avaliar o risco de ingestão de nitrito por consumo de refeições da cantina.

Tabela 3.2 Compilação dos resultados dos ensaios de recuperação referentes ao nitrito.

Refeição	Recuperação (nc = 95 %, k = 2)	Verificação
02 de abril de 2024	(1,66 ± 0,86)	Verdadeiro
03 de abril de 2024	(-1,26 ± 0,89)	Falso
04 de abril de 2024	(6,42 ± 1,57)	Falso
10 de abril de 2024	(-1,96 ± 1,14)	Falso
24 de abril de 2024	(-1,17 ± 1,14)	Falso
24 de abril de 2024 ii	(-0,71 ± 0,22)	Falso
29 de abril de 2024	(-1,91 ± 0,39)	Falso
03 de junho de 2024	(-0,96 ± 0,74)	Falso
07 de junho de 2024	(-3,47 ± 2,48)	Falso

3.4 Nitrato

Pela observação da **Figura 3.6**, facilmente se nota um pico singular e bem definido, no cromatograma da amostra, a um tempo de retenção semelhante ao do nitrato. Verifica-se ainda, de forma inequívoca, um aumento de área associado à fortificação da amostra, ou seja, a um possível aumento do teor de nitrato. Estes fatores são fortes indícios da possibilidade do pico de interesse corresponder ao nitrato. Assim, confirmou-se a identidade do pico através de ensaios de recuperação. Como os calibradores utilizados nos ensaios de recuperação descritos na secção 2.5 continham os analitos nitrito e nitrato, em simultâneo, é possível identificar e quantificar o nitrato a partir das análises realizadas para o nitrito. Desta forma, continuaremos a utilizar o exemplo acima referente à refeição recolhida a 02 de abril de 2024. A análise cromatográfica da amostra e da amostra fortificada reporta as áreas dos picos aos 7,2 minutos, suspeitos de serem nitrato, que foram posteriormente interpoladas ($x_a = \frac{y_a - a}{b}$) através da reta de calibração obtida para a semana de 01 a 05 de abril de 2024 ($y = 19,15x + 1,16$), de modo a obter a concentração mássica de nitrato, γ nas amostras. Na **Tabela 3.3** encontram-se compilados todos estes dados. Este ensaio apresentou uma recuperação de (1,07 ± 0,27) (nc = 95 %, k = 2), a partir das equações (2.1) e (2.2). Pelo critério de aceitação descrito na equação (2.9), o pico suspeito pode ser identificado como nitrato.

Tabela 3.3 Áreas e tempos de retenção relativos ao nitrato obtidos pela análise cromatográfica, em duplicado, da amostra e da amostra fortificada e concentração estimada pela folha de cálculo, conforme mencionado em 2.1.

	Amostra		Amostra fortificada	
	i	ii	i	ii
$A_{NO_3^-}$ / mAU×min	5,885	6,295	11,218	10,157
$t_{rNO_3^-}$ /min	7,19	7,16	7,23	7,21
γ /mg L ⁻¹	(0,257 ± 0,091) (nc = 95 %, k = 2)		(0,497 ± 0,085) (nc = 95 %, k = 2)	

Todos os ensaios de recuperação (**Tabela 3.4**) verificaram o critério de aceitação, pelo que, o nitrato pode ser identificado e quantificado. Consequentemente, é possível avaliar o risco de ingestão de nitrato por consumo de refeições na cantina.

Tabela 3.4 Compilação dos resultados dos ensaios de recuperação referentes ao nitrato.

Refeição	Recuperação (nc = 95 %, k = 2)	Verificação
02 de abril de 2024	(1,07 ± 0,27)	Verdadeiro
03 de abril de 2024	(1,12 ± 0,24)	Verdadeiro
04 de abril de 2024	(0,87 ± 0,25)	Verdadeiro
10 de abril de 2024	(0,97 ± 0,44)	Verdadeiro
24 de abril de 2024	(1,00 ± 0,32)	Verdadeiro
24 de abril de 2024 ii	(1,04 ± 0,17)	Verdadeiro
29 de abril de 2024	(1,14 ± 0,23)	Verdadeiro
03 de junho de 2024	(0,95 ± 0,20)	Verdadeiro
07 de junho de 2024	(0,96 ± 0,30)	Verdadeiro

3.4.1 Avaliação de risco de ingestão de nitrato

A avaliação de risco de ingestão de nitrato por utentes da cantina escolar foi realizada através da aplicação do método de Monte Carlo, para 9999 ensaios, utilizando folhas de cálculo do *software* MS-Excel, desenvolvidas para este fim, durante este trabalho.

A avaliação de risco permite obter uma função de densidade de probabilidade para a quantidade ingerida de nitrato numa refeição, que se encontra representada por um histograma na **Figura 3.9**. Caso os utentes da cantina escolar, que pesem aproximadamente entre 40 kg e 80 kg, consumam uma refeição da cantina, estes ingerem, em média, (0,66 ± 0,01) mg de nitrato por kg corporal (nc = 95 %, *t-sudent* de duas caudas). As três refeições com maior teor de nitrato foram recolhidas a 29 de abril, 31 de maio e 11 de abril, no ano de 2024, apresentando frações mássicas de nitrato de (0,140 ± 0,005) mg por g de refeição (nc = 95 %, k = 2), (0,119 ± 0,005) mg g⁻¹ (nc = 95 %, k = 2) e (0,117 ± 0,011) mg g⁻¹ (nc = 95 %, k = 2), respetivamente. As três refeições com menor teor de nitrato foram recolhidas a 19 de julho, 08 de abril e 25 de julho, no ano de 2024, apresentando frações mássicas de nitrato de (0,001 ± 0,010) mg g⁻¹ (nc = 95 %, k = 2), (0,005 ± 0,012) mg g⁻¹ (nc = 95 %, k = 2) e (0,006 ± 0,010) mg g⁻¹ (nc = 95 %, k = 2), respetivamente.

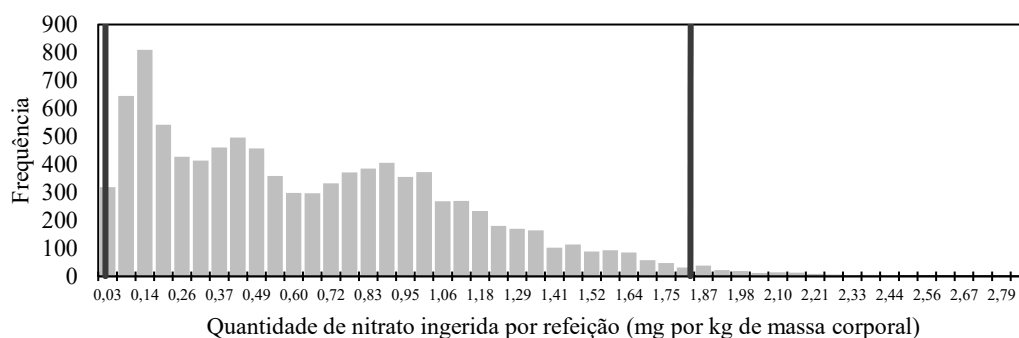


Figura 3.9 Simulação da quantidade de nitrato ingerida numa refeição da cantina por massa corporal do utente. As retas verticais escuras delimitam, da esquerda para a direita os percentis $P_{2,5}$ e $P_{97,5}$.

A função de densidade de probabilidade da ingestão de nitrato em duas refeições no mesmo dia, foi simulada considerando a quantidade diária ingerida dada pela equação (2.10). A quantidade ingerida de nitrato é então de $(1,32 \pm 0,01)$ mg de nitrato por kg corporal ($nc = 95\%$, *t-sudent* de duas caudas), com uma probabilidade de $0,16\%$ de ultrapassar a dose diária admissível considerada pela união europeia de $3,7$ mg de nitrato por kg de peso corporal.

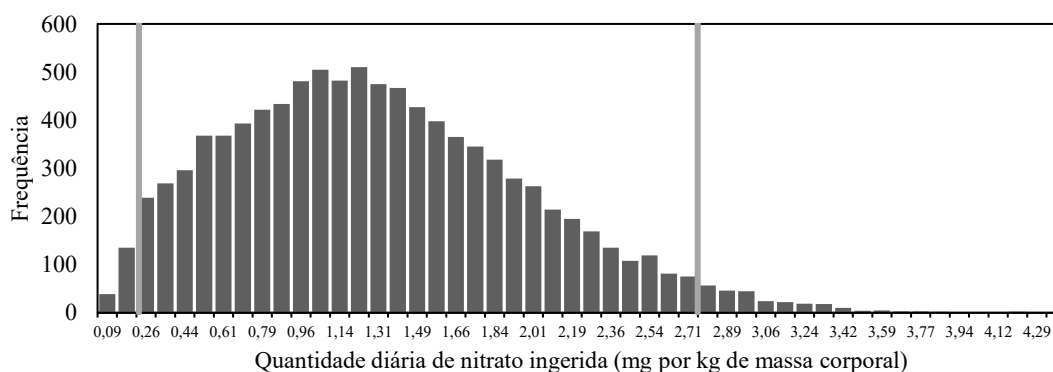


Figura 3.10 Simulação da quantidade de nitrato ingerida em duas refeições diárias da cantina por massa corporal do utente. As retas verticais claras delimitam, da esquerda para a direita os percentis $P_{2,5}$ e $P_{97,5}$.

3.4.2 Possíveis fontes de nitrato

Sabendo *à priori* que os vegetais, em particular alface e espinafres, são produtos alimentares com elevadas quantidades de nitrato e presentes na dieta mediterrânica, prevê-se que a fonte de nitrato mais relevante numa refeição seja o componente “salada”. Nesse caso, se os produtos hortícolas provêm de colheita local, é expectável que a concentração de nitrato nas refeições seja menor durante o período de verão em Portugal, correspondente aos meses de junho, julho e agosto, por estarem reunidas as condições que permitem uma menor acumulação de nitrato nos vegetais, nomeadamente, maior luminosidade e temperaturas mais elevadas. De facto, quando as frações mássicas de nitrato, w obtidas em cada refeição analisada são dispostas por ordem cronológica de recolha, como exemplificado na **Figura 3.11**, observa-se uma diminuição do teor de nitrato nas refeições recolhidas nos meses mais quentes. Confirmou-se ainda, presencialmente, a transição de alface e mistura de alfaces provenientes de embalagens disponíveis para venda nas grandes superfícies, nos meses de primavera, para alfaces de colheita local, nos meses de verão.

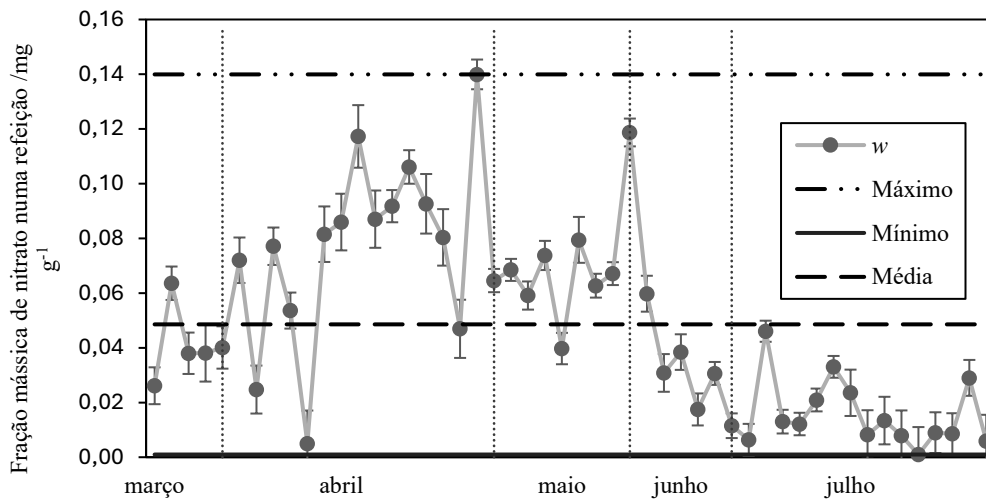


Figura 3.11 Fração mássica de nitrato w em cada refeição analisada, por ordem cronológica de recolha. As barras de erro representam a incerteza expandida $U(w)$ ($n_c = 95\%$, $k = 2$). As retas verticais delimitam o mês em que foram recolhidas as refeições.

Investigou-se o impacto dos acompanhamentos hortícolas na fração mássica de nitrato nas refeições através da análise de uma alíquota representativa da refeição com e sem estes acompanhamentos, conforme descrito na secção 2.7.1. A variação de concentração de nitrato no extrato é verificada visualmente pelas alterações na área do pico referente ao nitrato. Por exemplo, para a refeição recolhida a 30 de abril de 2024 nota-se uma redução de 63 % da área do pico do nitrato, aos 7 minutos, do cromatograma representativo da refeição para o da refeição sem o acompanhamento hortícola (**Figura 3.12**).

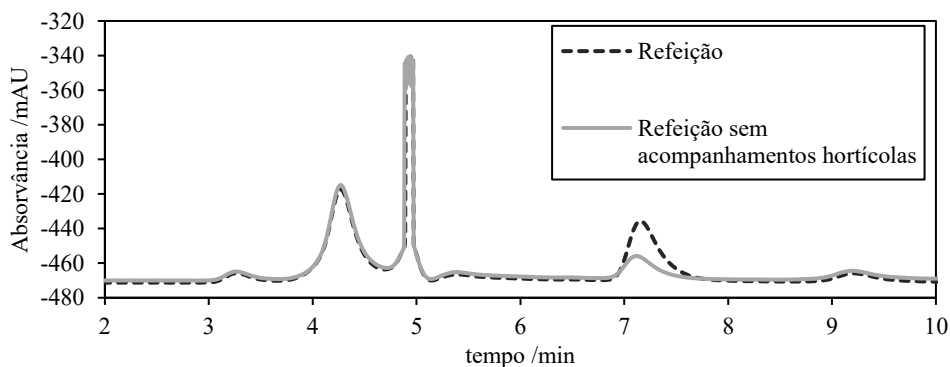


Figura 3.12 Sobreposição dos cromatogramas referentes à análise da refeição de 30 de abril de 2024 com e sem acompanhamentos hortícolas, nomeadamente, mistura de alfaces. Os cromatogramas foram obtidos nas condições cromatográficas de 2.4.

A remoção dos acompanhamentos mencionados levou a uma diminuição da fração mássica de nitrato nas quatro refeições (**Figura 3.13**), sendo a redução mais significativa, de 83 %, para o acompanhamento alface e cenoura, e a menor de 48 % para grelos salteados. Como o componente “salada” contribui entre os 50 % e 80 % para a fração mássica de nitrato na refeição, conclui-se que seja a principal fonte de nitrato. Depreende-se ainda que diferentes acompanhamentos hortícolas contribuem de forma desigual para o teor de nitrato na refeição.

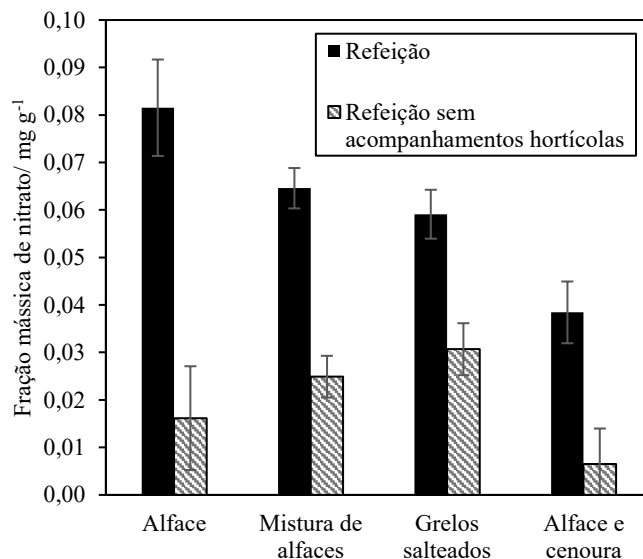


Figura 3.13 Fração mássica de nitrato para quatro refeições recolhidas a 09 (alfaca) e 30 de abril de 2024 (mistura de alfaces), 13 de maio de 2024 (grelos salteados) e 06 de junho de 2024 (alfaca e cenoura) evidenciando uma diminuição da fração mássica de nitrato da refeição com e sem produtos hortícolas de 80 %, 61 %, 48 % e 83 %, respetivamente. As barras de erro representam a incerteza expandida $U(w)$ ($nc = 95 \%$, $k = 2$).

A fim de apurar quais e de que forma os restantes componentes da refeição contribuem para o teor de nitrato na refeição, procedeu-se à análise de alíquotas nas quais foram progressivamente adicionados componentes da refeição, conforme descrito na secção 2.7.2. Por exemplo, a primeira alíquota analisada representa o componente “sopa”, a segunda, a mistura dos componentes “sopa” e “salada”, a terceira, “sopa”, “salada” e “sobremesa”, e assim sucessivamente, até à última alíquota, representativa da refeição total. Uma análise preliminar dos cromatogramas referentes a cada alíquota (**Figura 3.14**), revela que a sopa contém um teor de nitrato relevante e que o teor de nitrato na refeição aumenta com a adição da salad, por comparação das áreas do pico do nitrato aos 7 minutos. Após a adição da fruta ao sistema, a área do pico do nitrato diminuiu significativamente e continuou a diminuir com a adição dos restantes componentes. Note-se ainda que a adição de fruta levou ao aparecimento de dois novos picos aos 3,5 minutos e 9 minutos, e a adição de carne um novo pico aos 12,5 minutos.

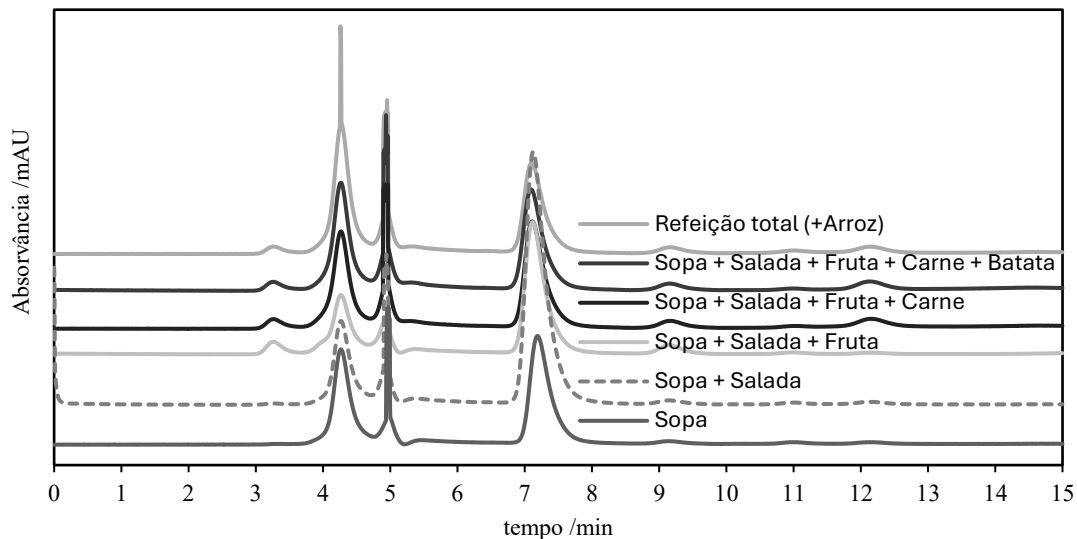


Figura 3.14 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise da refeição recolhida a 02 de maio de 2024. Os cromatogramas foram obtidos nas condições cromatográficas de 2.4.

Por aplicação do método de Monte Carlo com recurso à folha de cálculo MS-Excel especialmente criada para este fim, realizaram-se 9999 simulações para determinar a fração mássica de nitrato w_B de cada componente da refeição. Estes resultados encontram-se representados na **Tabela 3.5**. A “fruta” foi o único componente que não apresentou nitrato e a contribuição dos componentes “carne” e “arroz” para a fração mássica de nitrato na refeição foi quase nula.

Tabela 3.5 Fração mássica de nitrato dos vários componentes da refeição em mg por g de componente da refeição de 02 de maio de 2024.

Componente	w_B / mg g ⁻¹ (nc = 95 %, <i>t-student</i> de duas caudas)
Sopa	(0,15400 ± 0,00008)
Salada	(2,511 ± 0,001)
Fruta	-
Carne	(0,00200 ± 0,00005)
Batata	(0,09600 ± 0,00009)
Arroz	(0,0010 ± 0,0004)

Considerando as massas destes componentes na refeição, conclui-se que a sopa e a salada são as principais fontes de nitrato representando 37 % e 56 %, respetivamente, da quantidade de nitrato presente na refeição.

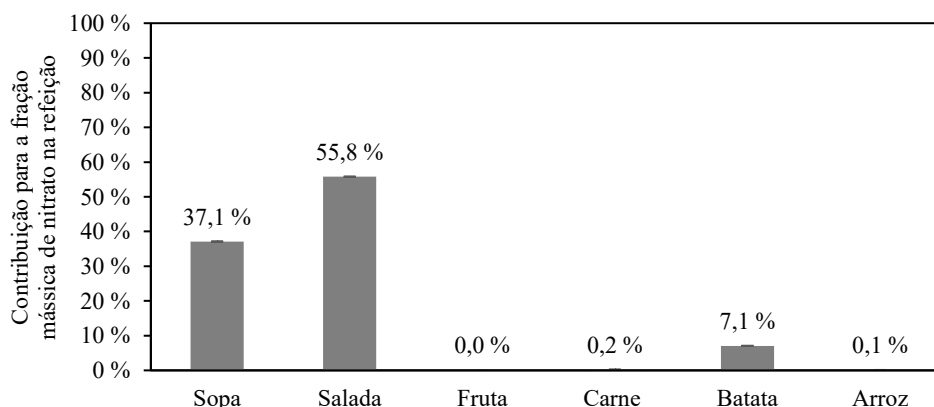


Figura 3.15 Contribuição percentual de cada componente para a quantidade de nitrato presente na refeição recolhida a 02 de maio de 2024.

Apesar da fração mássica de nitrato da sopa representar apenas 6 % da fração mássica da salada, a diferença absoluta de contribuição entre estes componentes é de 18 %. Esta disparidade advém, do facto da sopa representar 37 % da massa da refeição enquanto a salada representa apenas 3 %. Desta forma, compilaram-se os resultados de fração mássica de nitrato na refeição,

dispostos por ordem cronológica de recolha, sobrepondo-os com a contribuição mássica da sopa e da salada para a massa total da refeição. Pela análise da **Figura 3.16**, percebe-se que não existe uma correlação óbvia que implique que a uma maior fração mássica de nitrato na refeição esteja associada uma maior quantidade de sopa ou salada, pelo que não é um fator que tenha dominado o teor de nitrato nas refeições recolhidas.

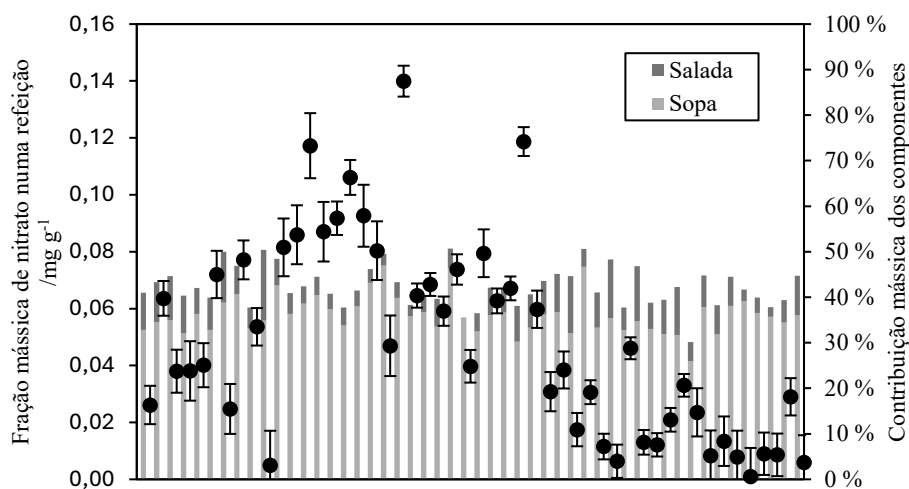


Figura 3.16 Fração mássica de nitrato, w em cada refeição analisada por ordem cronológica de recolha. As barras de erro representam a incerteza expandida $U(w)$ ($nc = 95\%$, $k = 2$).

Como as variações na tipologia dos acompanhamentos hortícolas originaram um elevado impacto na fração mássica de nitrato na refeição e as variações de massa destes acompanhamentos não demonstraram qualquer correlação com a fração mássica de nitrato na refeição, analisou-se, qualitativamente, as três refeições com as frações mássicas de nitrato mais elevadas (**Tabela 3.6**) e as três com as mais baixas (

Tabela 3.7). As refeições que apresentaram as frações mássicas de nitrato mais elevadas tinham como “salada” a alface ou mistura de alfaces e foram recolhidas nos meses em que eram utilizadas alfaces pré-embaladas adquiridas em grandes superfícies. Duas das refeições com menor fração mássica de nitrato têm como acompanhamento hortícola vegetais cozinhados, sendo que a outra refeição continha alface e foi recolhida durante o Verão, posterior ao início da utilização de produtos hortícolas locais e sazonais.

Tabela 3.6 Descrição qualitativa das três refeições com maior fração mássica de nitrato na refeição, por ordem decrescente de fração mássica de nitrato.

Data de recolha	Sopa	Prato Principal	Salada	Sobremesa
29 de abril de 2024	De lombardo	Strogonoff de peru com arroz e batata	Mistura de alfaces	Banana
31 de maio de 2024	Creme de legumes	Costeleta grelhada com esparguete	Alface	Maça vermelha
11 de abril de 2024	Couve portuguesa	Carapau grelhado com batata cozida	Alface	Iogurte

Tabela 3.7 Descrição qualitativa das três refeições com menor fração mássica de nitrato na refeição, por ordem crescente de fração mássica de nitrato.

Data de recolha	Sopa	Prato Principal	Salada	Sobremesa
19 de julho de 2024	De feijão encarnado com couve portuguesa	Bifinhos de franco com cogumelos e arroz	Alface	Banana
08 de abril de 2024	Creme de brócolos	Frango assado com arroz e ervilhas	Favas	Maça verde
25 de julho de 2024	Primavera	Filetes de pescada com arroz de cenoura	Grelos	Maça verde

Conclui-se que a principal fonte de nitrato numa refeição é a salada e os principais fatores que influenciam a contribuição da salada para a fração mássica de nitrato na refeição são a composição, sazonalidade e preparação dos acompanhamentos hortícolas. A sopa, apesar de ter uma fração mássica de nitrato mais baixa que a salada, representa mais de 30 % da massa total da refeição, tornando-se na segunda principal fonte de nitrato.

3.4.3 Impacto das condições de armazenamento no teor de nitrato

No decorrer deste trabalho, os extratos obtidos após o procedimento de extração foram recolhidos para recipientes opacos e armazenados num frigorífico à temperatura de 4 °C. Para verificar o impacto deste armazenamento na concentração de nitrato, analisou-se o extrato pertencente à refeição recolhida a 21 de março de 2024 em vários dias. Pela **Figura 3.17**, confirma-se que a concentração de nitrato se manteve constante, considerando a incerteza das estimativas, e, portanto, o método de armazenamento é adequado para conservar as amostras para posterior análise.

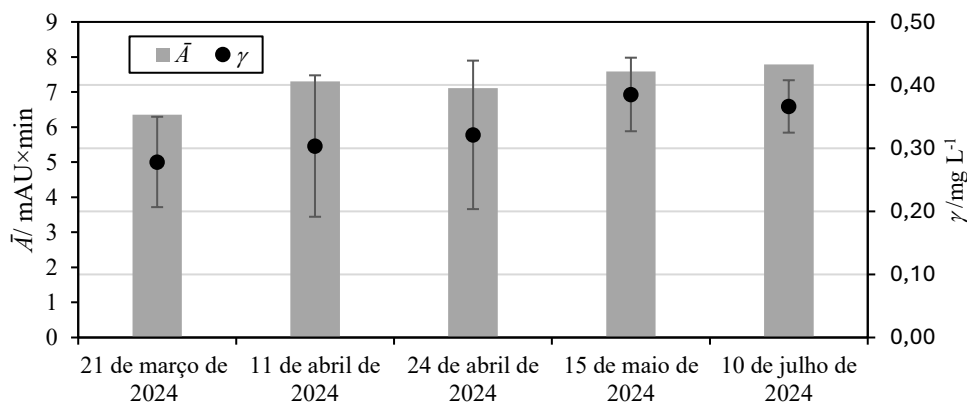


Figura 3.17 Concentração mássica de nitrato no extrato da refeição recolhida a 21 de março. As barras de erro representam a incerteza expandida $U(\gamma)$ (nc = 95 %, $k = 2$). Por ordem cronológica, foram obtidas as concentrações de $(0,28 \pm 0,07)$ mg L⁻¹, $(0,30 \pm 0,11)$ mg L⁻¹, $(0,32 \pm 0,12)$ mg L⁻¹, $(0,39 \pm 0,06)$ mg L⁻¹ e $(0,37 \pm 0,04)$ mg L⁻¹.

Para averiguar o impacto do armazenamento por refrigeração a 4 °C na fração mássica de nitrato na refeição, optou-se por guardar a massa da refeição que não foi utilizada para perfazer a alíquota de 10 g num gobelé selado com parafilme. A refeição utilizada neste estudo foi recolhida a 02 de maio de 2024 e o seu extrato apresenta uma fração mássica de nitrato de $(0,12 \pm 0,07)$ mg g⁻¹ (nc = 95 %, $k = 2$). Essa mesma refeição foi sujeita a um novo processo de extração a 15 de maio de 2024 e o extrato resultante apresenta uma fração mássica de $(0,06 \pm 0,007)$ mg g⁻¹ (nc = 95 %, $k = 2$). Isto implica uma redução de 50 % da fração mássica de nitrato durante o período de armazenamento.

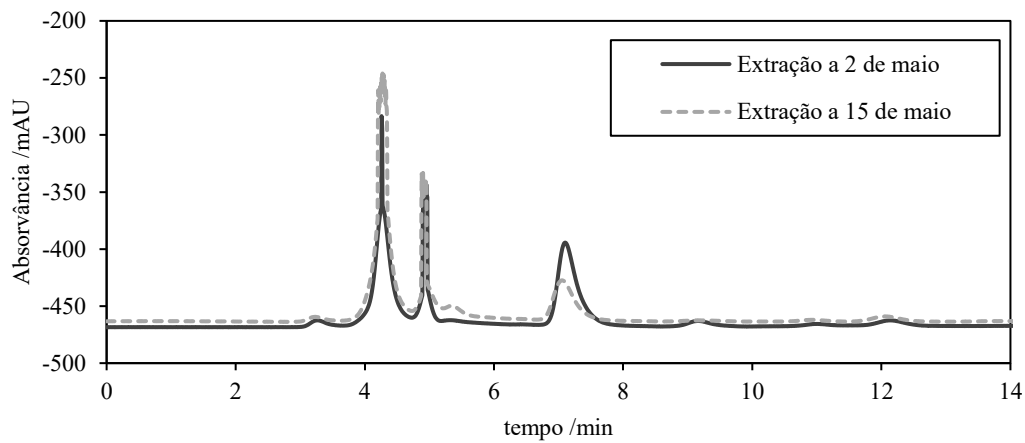


Figura 3.18 Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise do impacto do armazenamento da refeição de 02 de maio de 2024. A análise do cromatograma do extrato da refeição indica uma concentração de nitrato de $(1,32 \pm 0,07) \text{ mg L}^{-1}$. A análise do extrato da refeição cujo processo de extração foi realizado a 15 de maio de 2024 indica uma concentração de nitrato é de $(0,66 \pm 0,06) \text{ mg L}^{-1}$ ($n_c = 95\%$, $k = 2$). Os cromatogramas foram obtidos nas condições cromatográficas de 2.4.

Desta forma, conclui-se que existem indicações de que o teor de nitrato nos extratos aquosos das refeições é menos perceptível que o teor do mesmo ião nas refeições. No entanto, esta tendência deve ser avaliada numa diversidade de refeições para se poder confirmar a constatação.

4 Conclusões

O objetivo deste trabalho era avaliar o risco de ingestão de nitrito e de nitrato em refeições provenientes de uma cantina escolar. Não foi possível avaliar o risco de ingestão de nitrito, uma vez que não foi possível identificá-lo nas amostras. Nos cromatogramas das primeiras refeições recolhidas, ao tempo de retenção esperado para o nitrito, existia um pico de área bastante reduzida e extremamente deformado, não estando resolvido do pico adjacente. Os ensaios de recuperação permitiram concluir que não existia nitrito ou existia em teores demasiado baixos para a sua identificação, nas condições experimentais usadas. Com o decorrer do trabalho, um pico bem definido e de área mensurável, a um tempo de retenção na zona expectável para o nitrito, começou a aparecer em diversas amostras, contudo, os ensaios de recuperação não respeitaram o critério de aceitação e esse pico não pode ser identificado como nitrito. O risco de ingerir uma quantidade de nitrato acima da dose diária admissível, consumindo exclusivamente duas refeições da cantina por dia, é de 0,16 %.

No decorrer desta dissertação, o protocolo experimental sofreu alterações com o intuito de perceber o impacto dos diferentes componentes da refeição na concentração de nitrato. Estes estudos sugerem que o componente “salada” representa a principal fonte de nitrato, contribuindo entre 50 % e 80 % para a fração mássica de nitrato na refeição. O segundo componente com maior contribuição foi a sopa. Tendo em conta que a sopa, constituída por produtos hortícolas cozinhados e diluídos em água, contribui significativamente menos que o componente “salada” e que, duas das três refeições com menor concentração de nitrato apresentavam grelos salteados e favas cozidas como acompanhamento, os dados recolhidos podem sugerir que os vegetais cozinhados apresentam um menor teor de nitrato que os vegetais crus por extração ou diluição dos seus fluídos. Considerando o componente “salada” como a principal fonte de nitrato, podemos ainda admitir que a diminuição substancial da concentração de nitrato nas refeições recolhidas nos meses de junho e julho, face aos meses de março, abril e maio, pode ser justificada pela variação sazonal da concentração de nitrato nos produtos hortícolas locais.

Conclui-se que a metodologia para análise de refeições que melhor reflete a quantidade ingerida de nitrato e, conseqüentemente, produz uma avaliação de risco mais fiável, considera a refeição no seu todo em vez da soma de valores de concentração singulares que não refletem a diversidade de concentrações para um mesmo alimento.

5 Perspetivas futuras

A continuidade deste trabalho originará avanços no âmbito da medicina preventiva, na medida que, uma avaliação de risco mais completa e realizada durante um intervalo de tempo que acompanhe a população durante uma geração ajudará a perceber a relação entre os hábitos alimentares e o risco de doenças e condições relativas ao consumo de nitrito e nitrato.

A avaliação de risco poderá ser expandida através do aumento do número de analitos estudados, nomeadamente, precursores, promotores e inibidores do processo de nitrosação. Poder-se-ia ainda estudar a ingestão durante todo o ano e abranger dietas para além da mediterrânea, como a vegetariana. Seria de grande interesse comparar os resultados obtidos nas refeições da cantina escolar com os de um *snack-bar* ou até mesmo de alguns restaurantes *fast food* que se encontrem junto do recinto escolar.

Em suma, dever-se-ia prosseguir este tema de modo a otimizar determinações analíticas que envolvem a caracterização de múltiplos componentes das refeições, considerando aspetos sociais, culturais e económicos que determinam e influenciam os hábitos alimentares.

6 Bibliografia

- (1) Decreto-Lei N^o314/72. Diário do Governo n.º 191/1972, Série I de 1972-08-17 pp 1083–1085.
- (2) Martín León, V.; Luzardo, O. P. Evaluation of Nitrate Contents in Regulated and Non-Regulated Leafy Vegetables of High Consumption in the Canary Islands, Spain: Risk Assessment. *Food and Chemical Toxicology* **2020**, *146* (May). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111812>.
- (3) Agência de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). Exposição aos nitratos e nitritos <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/nitratos/exposicao-aos-nitratos-e-nitritos.aspx> (accessed Dec 12, 2023).
- (4) Veiga, A.; Lopes, A.; Carrilho, E.; Silva, L.; Dias, M. B.; Seabra, M. J.; Borges, M.; Fernandes, P.; Nunes, S. *Perfil de Risco Dos Principais Alimentos Consumidos Em Portugal*; Ministério da Economia e da Inovação: Portugal, 2009.
- (5) Honikel, K.-O. The Use and Control of Nitrate and Nitrite for the Processing of Meat Products. *Meat Science* **2008**, *78* (1–2), 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.030>.
- (6) Siu, D. C.; Henshall, A. Ion Chromatographic Determination of Nitrate and Nitrite in Meat Products. *Journal of Chromatography A* **1998**, *804* (1–2), 157–160. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01245-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01245-4).
- (7) Zhang, Y.; Zhang, Y.; Jia, J.; Peng, H.; Qian, Q.; Pan, Z.; Liu, D. Nitrite and Nitrate in Meat Processing: Functions and Alternatives. *Current Research in Food Science* **2023**, *6*, 100470. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100470>.
- (8) European Commission. Food and Feed Information Portal Database: E-249, E-250 <https://ec.europa.eu/food/food-feed-portal/screen/food-additives/search/details/POL-FAD-IMPORT-3057> (accessed Oct 1, 2025).
- (9) European Commission. Food and Feed Information Portal Database: E-251, E-252 <https://ec.europa.eu/food/food-feed-portal/screen/food-additives/search/details/POL-FAD-IMPORT-3060> (accessed Oct 1, 2025).
- (10) *Nitrates and Nitrites in Food and Water*; Hill, M., Ed.; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, England, 1996.
- (11) Lopez-Moreno, C.; Perez, I. V.; Urbano, A. M. Development and Validation of an Ionic Chromatography Method for the Determination of Nitrate, Nitrite and Chloride in Meat. *Food Chemistry* **2016**, *194*, 687–694. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.017>.
- (12) Karwowska, M.; Kononiuk, A. Nitrates/Nitrites in Food—Risk for Nitrosative Stress and Benefits. *Antioxidants* **2020**, *9* (3). <https://doi.org/10.3390/antiox9030241>.
- (13) Vasco, E.; Dias, M. G.; Oliveira, L. The First Harmonised Total Diet Study in Portugal: Nitrate Occurrence and Exposure Assessment. *Food Chemistry* **2022**, *392*, 133152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133152>.
- (14) Commission, T. H. E. E. Statement on Possible Public Health Risks for Infants and Young Children from the Presence of Nitrates in Leafy Vegetables. *EFSA Journal* **2010**, *8* (12), 2010–2012. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1935>.
- (15) Oficial, J. *Regulamento (UE) 2023/2108*; 2023.
- (16) Prasad, S.; Chetty, A. A. Nitrate-N Determination in Leafy Vegetables: Study of the Effects of Cooking and Freezing. *Food Chemistry* **2008**, *106* (2), 772–780.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.005>.

- (17) Pysz, K.; Leszczyńska, T.; Bieżanowska-Kopec, R.; Kopec, A. Chemical Assessment of Lead, Cadmium, Nitrate, and Nitrite Intakes with Daily Diets of Children and Adolescents from Orphanages in Krakow, Poland. *Environmental Science and Pollution Research* **2016**, *23* (24), 25200–25209.
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-7550-z>.
- (18) EN 12014-4:2005 - Foodstuffs - Determination of nitrate and or nitrite content - Part 4
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/9ce64b65-67c5-4d99-a4ea-6f24c790ec33/en-12014-4-2005> (accessed Mar 24, 2025).
- (19) Petroczi, A. Determination of Nitrate and Nitrite Content of Dietary Supplements Using Ion Chromatography. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques* **2014**, *s12* (01).
<https://doi.org/10.4172/2155-9872.s12-003>.
- (20) Martins Camoretto, T.; Da Silva Ferreira, E.; Bernardino Colvero, R. Métodos De Análise <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/nitratos/metodos-de-analise.aspx> (accessed May 1, 2025).
- (21) Cataldo, D. A.; Haroon, M. H.; Schrader, L. E.; Youngs, V. L. Rapid Colorimetric Determination of Nitrate in Plant Tissue by Nitration of Salicylic Acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **1975**, *6* (1), 71–80.
<https://doi.org/10.1080/00103627509366547>.
- (22) Huarte-Mendicoa, J. C.; Astiasarán, I.; Bello, J. Nitrate and Nitrite Levels in Fresh and Frozen Broccoli. Effect of Freezing and Cooking. *Food Chemistry* **1997**, *58* (1–2), 39–42.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00193-8).
- (23) Skoog, D. A. (Stanford U.; West, D. M. (San J. S. U.; Holler, F. J. (University of K. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th ed.; Saunders College Publishing, Ed.; Harcourt Brace College Publishers: Fort Worth, Philadelphia, San Diego, New York, Orlando, Austin, San Antonio, Toronto, Montreal, London, Sydney, Tokyo, 1996.
- (24) Bettencourt da Silva, R. J. N. Modelação Do Desempenho de Métodos Analíticos Complexo, Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa, 2004.
- (25) Pluháček, T.; Milde, D.; Součková, J.; Bettencourt da Silva, R. J. N. Tutorial and Spreadsheet for the Evaluation of Instrumental Quantification Uncertainty by the Linear Weighted Regression Model: Determination of Elemental Impurities in a Nasal Spray by ICP-MS. *Talanta* **2021**, 225.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122044>.
- (26) McKillup, S. *Statistics Explained*, 2nd ed.; Press, C. U., Ed.; Cambridge University Press, New York, 2012.
- (27) Van, H. F. E. *Statistics for Terrified Biologists*, 3rd ed.; BLACKWELL PUBLISHING, 2009.
- (28) Rubinson, K. A. *Chemical Analysis*; Little, Brown and Company: Boston, Toronto, 1986.
- (29) Instituto Português da Qualidade (IPQ); Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia (Inmetro). *Vocabulário Internacional de Metrologia*, 1st ed.; 2012.
- (30) (Eds), S. L. R. E. and A. W. *Eurachem/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Third Edition.; 2012.
- (31) Bulska, E.; Papadakis, I.; Taylor, P.; Bettencourt da Silva, R.; Gegevičius, V.; Magnusson, B.; Godlewska-Żyłkiewicz, B.; Vassileva, E.; Majcen, N.; Marinčić, S.; Patriarca, M.; Hedrich, M. *Analytical Measurement – Measurement Uncertainty and Statistics*; Gegevičius, V., Majcen, N., Eds.; Publications Office: France, 2012.
<https://doi.org/doi/10.2787/58527>.

- (32) Rosa, N. F.; Monteiro, O. C.; Camões, M. F.; da Silva, R. J. N. B. Evaluation and Optimisation of Methylene Blue Removal Measurement Uncertainty in Photodegradation Studies. *Accreditation and Quality Assurance* **2017**, *22* (4), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s00769-017-1272-x>.
- (33) José, J. Estudo Do Perfil de Macronutrientes Em Espécies Vegetais Regadas Com Águas Residuais Tratadas, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 2024.
- (34) Eletter, S. F.; Elrefae, G. A.; Yaseen, S. G.; Alshehadeh, A. R. Using Monte Carlo Simulation for Real Estate Price Valuation. *2024 25th International Arab Conference on Information Technology, ACIT 2024* **2024**, 1–4. <https://doi.org/10.1109/ACIT62805.2024.10876955>.
- (35) Mianeh, H. Y.; Amiri, L.; Jafari, A.; Nourozi, N. Health Risk Assessment via Monte Carlo Simulation and Sensitivity Analysis for Fluoride and Nitrate Content in Bottled Waters Consumed in Kermanshah City, Iran. *Scientific Reports* **2025**, *15* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-89439-6>.
- (36) Keller, R. M.; Beaver, L.; Prater, M. C.; Hord, N. G. Dietary Nitrate and Nitrite Concentrations in Food Patterns and Dietary Supplements. *Nutrition Today* **2020**, *55* (5), 218–226. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000253>.

7 Anexos

No seguinte *link* (<https://cirrus.ciencias.ulisboa.pt/owncloud/s/oWmqrEoSDGE5bgR>) encontram-se disponibilizadas as folhas de MS-Excel relativas a:

- i) **Avaliação do risco de exposição a nitrato**, onde se encontra a folha de cálculo da avaliação de risco com aplicação do método de Monte Carlo;
- ii) **Compilação dos cromatogramas das refeições**, onde se encontram os cromatogramas obtidos para todas as refeições analisadas;
- iii) **Outras observações relativamente ao nitrato**, onde se encontra a determinação de w_B com base no método de Monte Carlo, as frações mássicas por ordem cronológica e as observações das análises das refeições com e sem verduras;
- iv) **Validação da curva de calibração do nitrato**;
- v) **Validação da curva de calibração do nitrito**.