

# Confiabilidade dos resultados analíticos no monitoramento do teor de iodo em sal para o consumo humano - Validação da metodologia e incerteza de medição

## Reliability of analytical results from iodine rate-monitoring in salt for human consumption: methodology validation and measurement uncertainty

### RESUMO

Marcia Regina Pennacino do Amaral Mello\*

Jamila Barbosa

O sal para consumo humano é utilizado como veículo para aumentar a ingestão de iodo pela população e evitar os Distúrbios por Deficiência de Iodo (DDIs). Esta prática é adotada mundialmente sob recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) e monitorada por meio de programas governamentais. A determinação de iodo no sal, adicionado na forma de iodato, é um método clássico, utilizado no monitoramento nacional, e apesar de ser tradicionalmente a metodologia mais utilizada para quantificação de iodo, não possui critérios de desempenho oficialmente documentados que possam contribuir e subsidiar ações em Vigilância Sanitária. A proposta deste estudo foi avaliar os parâmetros de desempenho da determinação de iodo no sal, adicionado na forma de iodato, por titulação iodométrica e calcular sua incerteza de medição, visando comprovar a confiabilidade dos resultados. Os resultados obtidos precisam ser exatos e precisos para que possam dar subsídio aos programas de monitoramento. O estudo foi realizado em oito níveis de concentração de 2 a 100 mg/kg de forma a contemplar os diferentes níveis de iodo já estabelecidos nas legislações. O método apresentou-se robusto; com seletividade sem interferências de matriz; linearidade para a faixa de trabalho com  $r^2 = 0,99998$ ; limite de detecção adotado por avaliação visual em 1 mg/kg; limite de quantificação de 2 mg/kg; recuperação de 98 a 101%; desvio-padrão relativo  $\leq 7,15\%$ ; limite de repetibilidade de 0,55 mg/kg e precisão intermediária, onde  $p = 0,41$ , demonstrando não haver diferença entre analistas. A incerteza de medição foi estabelecida em 0,93 mg/kg com nível de confiança de 95,45%.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sal; Iodo; Iodato de potássio; Validação; Incerteza de medição; Programas de monitoramento

### ABSTRACT

Salt for human consumption is used to increase iodine intake and prevent Iodine Deficiency Disorders. This worldwide practice is recommended by the World Health Organization and monitored by government programs. The determination of iodine content in salt, added as potassium iodate, is a classic method used in national monitoring. Despite being the most common iodine-quantification method, it is not documented in publications to support Sanitary Surveillance initiatives. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of iodine determination in salt, added as potassium iodate, by iodometric titration and calculate its measurement uncertainty to investigate the reliability of the results. The results need to be accurate and precise to standardize monitoring programs. The study was conducted in eight concentrations, from 2 to 100 mg/kg. The method is robust. It features selectivity without matrix interference, linearity ( $r^2 = 0.99998$ ) through the range of values studied, detection limit set by visual evaluation at 1 mg/kg, quantitation limit of 2 mg/kg, 98-101% recovery, relative standard deviation  $\leq 7.15\%$ , inter-operator reproducibility as shown by a repeatability limit of 0.55 mg/kg, and intermediate precision ( $p = 0.41$ ). The measurement uncertainty was set at 0.93 mg/kg with a 95.45% confidence level.

**KEYWORDS:** Salt; Iodine; Potassium iodate; Validation; Uncertainty measurement; Monitoring programs

Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo, SP, Brasil

\* E-mail: mrmello@ial.sp.gov.br

Recebido: 07 nov 2014

Aprovado: 28 abr 2015





O Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO)<sup>13</sup> orienta sobre a necessidade da validação documentada de métodos químicos, fundamentados na *Internacional Organization for Standardization*, ISO 17025:2005<sup>14</sup>, que recomenda a validação de métodos não normalizados, ou métodos normalizados com alterações, visando confirmar que o método é indicado para o uso pretendido. Outro requisito importante da ISO 17025 é a estimativa da incerteza de medição, onde todos os componentes de incerteza que sejam importantes devem ser considerados usando-se métodos de análise apropriados. A estimativa da incerteza deve estar baseada no conhecimento do desempenho do método e no escopo da medição e deve fazer uso de experiência e dados de validação.

Com a crescente demanda de confiabilidade e comparabilidade de medidas analíticas realizadas em diferentes laboratórios, aumenta-se a exigência pela implantação de uma infraestrutura metrológica, com foco no reconhecimento mútuo e na eliminação de barreiras técnicas entre os países<sup>15</sup>.

Neste contexto, a validação possibilita ao laboratório demonstrar que tem condições de realizar o método de maneira adequada, dentro de parâmetros específicos existentes nas suas instalações para obtenção de resultados confiáveis e adequados à qualidade exigida<sup>13</sup>.

Ao mesmo tempo, a validação de um método analítico é de extrema importância para garantir que este seja exato, específico e reproduzível. Os parâmetros a serem validados variam de acordo com área de estudo, método utilizado, tipos de analito, de amostra e objetivo ao qual se destina o método desenvolvido<sup>13,15</sup>.

Seguindo as orientações do INMETRO<sup>13</sup> e do Protocolo de Validação ou Verificação de Métodos Químicos Quantitativos do Instituto Adolfo Lutz (P-SG-034)<sup>16</sup>, para analitos em concentrações menores que 0,01% (100 mg/kg), os seguintes parâmetros devem ser avaliados: faixa de trabalho e linearidade, seletividade, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão e precisão. O estudo da robustez do método não é obrigatório, mas recomendado antes da validação propriamente dita, para verificar a sensibilidade do método frente a pequenas variações que podem ocorrer durante sua execução<sup>13</sup>.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros de desempenho da determinação de iodo no sal, adicionado como iodato de potássio, por titulação iodométrica, e calcular sua incerteza de medição, visando comprovar a confiabilidade dos resultados de iodo gerados para possam dar subsídio aos programas de monitoramento.

## MATERIAL E MÉTODO

### Material

#### Amostras

Foram adquiridas três amostras de sal comercial com diferentes teores de iodo para avaliação da robustez e precisão intermediária.

### Reagentes e soluções

Cloreto de sódio p.a., iodato de potássio (pureza: 99,4-100,4%), iodeto de potássio livre de iodato p.a., ácido sulfúrico p.a., amido p.a. (todos da marca Synth®) e água grau reagente fervida.

Solução de ácido sulfúrico 0,5 M, solução de iodeto de potássio 1%, solução de amido 1%, solução de tiosulfato de sódio 0,1 M, solução de tiosulfato de sódio 0,005 M preparado diariamente e solução padrão de iodato de potássio (KIO<sub>3</sub>) para fortificação das amostras.

A solução de KIO<sub>3</sub> utilizada para fortificação foi preparada a partir de solução padrão de iodato de potássio com concentração correspondente a 1.000 mg de iodo/L, a partir da qual obteve-se duas soluções de fortificação, Solução A (0,01 mg/mL) e Solução B (0,1 mg/mL). Os níveis de concentração de iodo de 2 e 5 mg/kg foram obtidos com a Solução A e os demais níveis com a Solução B.

### Equipamentos e vidraria

Balança analítica, com resolução de 0,1 mg, calibrada; sistema de purificação de água tipo I (ultrapura), qualificado; buretas de 10 e 25 mL, pipetas volumétricas 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10 e 25 mL, balões volumétricos 500 mL e 1.000 mL, calibrados; pipetas graduadas de 2 e 5 mL; Erlenmeyer de 500 mL e espátulas. Os equipamentos e vidrarias volumétricas foram calibrados segundo a Rede Brasileira de Calibração (RBC).

### Métodos

#### Procedimento de análise

O método de ensaio foi realizado conforme descrito na Técnica 383/IV nos Métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz<sup>11</sup>. Pesou-se 10 g da amostra que foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, com auxílio de 200 mL de água. Agitou-se até a dissolução. Adicionou-se 5 mL de solução de ácido sulfúrico 0,5 M, 10 mL de iodeto de potássio 1% e titulou-se o iodo liberado com solução de tiosulfato de sódio 0,005 M, usando uma bureta de 10 mL até coloração amarelo pálido. Adicionou-se 2 mL de solução de amido a 1%, como indicador para visualização do ponto de viragem de violeta para incolor. O teor de iodo foi calculado pela de acordo com a Equação 1<sup>11</sup>.

$$\frac{V \times f \times 105,8}{m} = \text{mg de iodo/kg} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

V = mL da solução de tiosulfato de sódio 0,005 M gasto na titulação

f = fator da solução de tiosulfato de sódio 0,005 M

m = massa da amostra (g)

### Parâmetros da Validação

#### Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Assim, a seletividade do método



poderá ser verificada por meio da adição de concentrações idênticas do padrão em dois grupos: branco do ensaio (todos os reagentes utilizados sem a matriz) e matriz com ou sem o analito de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão do método estarão seriamente comprometidas<sup>13</sup>.

A seletividade foi avaliada utilizando-se a comparação entre dois grupos: Grupo 1 (água) e Grupo 2 (água + 10 g de cloreto de sódio p.a.), ambos fortificados com solução padrão de  $KIO_3$ , em oito níveis de concentração de iodo correspondentes a 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/kg, em três replicatas independentes, como utilizado na rotina do laboratório.

Os valores foram avaliados estatisticamente pelo teste de Grubbs, com 99% de confiança, para verificar a existência de valores aberrantes e pelo teste t pareado, com 95% de confiança, para avaliação da equivalência das médias entre os grupos. A comparação da inclinação das retas analíticas dos dois grupos avaliados foi realizada através das curvas de recuperação<sup>13,16</sup>.

#### Faixa de trabalho e linearidade

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra. Sempre que possível, o limite da legislação deve se situar no centro da faixa de trabalho<sup>13</sup>.

A faixa de trabalho foi preparada utilizando-se solução padrão de iodato de potássio ( $KIO_3$ ) em oito níveis de concentração correspondente a faixa teórica de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg de iodo por kg, sendo cada nível em três replicatas independentes.

A linearidade do método foi observada pelo gráfico da concentração de iodo experimental em função da concentração de iodo teórica, realizada por meio de curva de recuperação, confirmada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Para tal, foi verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração, pelo teste de Grubbs com 99% de confiança, e a avaliação do comportamento das variâncias ao longo da curva, para verificar se o sistema é homocedástico (variâncias iguais) ou heterocedástico (variâncias diferentes), foi aplicado o teste de Cochran, com 99% de confiança<sup>13,16</sup>. Os valores dos resíduos foram lançados em um gráfico e observado se a distribuição dos pontos era aleatória, livre de tendências. A homocedasticidade dos dados a partir do gráfico de resíduos, também deve ser avaliada antes de fazer a regressão linear<sup>13,16</sup>.

O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi utilizado para indicar evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão<sup>13,16</sup>.

#### Limites de detecção e quantificação

Limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada pelo método, porém não necessariamente quantificada<sup>13</sup>. No caso de métodos não instrumentais (titulação, comparação de cor ou cromatografia em camada delgada), esta determinação pode

ser realizada visualmente, onde o LD é o menor valor de concentração capaz de produzir efeito esperado (exemplo: mudança de cor ou turvação)<sup>13,16</sup>.

O Limite de Detecção do método foi realizado de forma visual por meio de adições sucessivas de  $KIO_3$  em concentrações decrescentes na amostra-branco do Grupo 2 (água + cloreto de sódio), até que a mesma não produzisse mudança de coloração. O LD também foi determinado de forma experimental por meio do desvio-padrão (DP) de seis replicatas independentes da amostra-branco com a adição da menor concentração do analito que gerasse mudança de coloração com um nível aceitável de precisão e exatidão, multiplicado pelo fator  $k = 3$ , como apresentado na Equação 2<sup>13,16</sup>.

$$LD = 0 + 3 \times DP \quad (\text{Equação 2})$$

O Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão<sup>13,16</sup>. Pode ser experimental por meio do desvio-padrão da amostra branco com a adição da menor concentração do analito, pelo fator que pode ser 5, 6 ou 10, adotado de acordo com avaliação crítica do analista<sup>13,16</sup>.

O Limite de Quantificação (LQ) foi determinado experimentalmente por meio do desvio-padrão de seis replicatas independentes da amostra-branco com adição de 2 mg/kg, multiplicado pelo fator  $k = 10$ , conforme Equação 3<sup>13,16</sup>.

$$LQ = 0 + 10 \times DP \quad (\text{Equação 3})$$

#### Exatidão

É o grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro do mensurando. Pode ser avaliado pelo uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação<sup>13</sup>.

A exatidão foi avaliada pela porcentagem de recuperação utilizando os resultados das análises do Grupo 2 (água + cloreto de sódio) fortificado com  $KIO_3$ , em oito níveis de concentração correspondente a faixa teórica de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg de iodo por kg, sendo cada nível em três replicatas independentes, avaliadas segundo critério de aceitação da AOAC<sup>13,16</sup>.

A exatidão foi calculada pela Equação 4 que relaciona a média da concentração de iodo experimental e a média da concentração de iodo teórico correspondente, para cada nível de concentração, em porcentagem<sup>13,16</sup>.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração de iodo experimental}}{\text{Concentração de iodo teórico}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

#### Precisão

A precisão de um método analítico constitui o grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, na mesma amostra ou em amostras similares, sob



condições específicas<sup>13,16</sup>. As três formas mais comuns de avaliar a precisão são: por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), usualmente expresso em %, também conhecido como desvio-padrão relativo (DPR), calculado segundo a Equação 5<sup>13,16</sup>.

$$CV (\%) = DPR = \frac{DP}{MIE} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

MIE: Média das replicatas de iodo experimental

A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade, limite de repetibilidade e precisão intermediária<sup>13,16</sup>.

#### Repetibilidade

O estudo da repetibilidade foi realizado no Grupo 2 (água + cloreto de sódio) fortificado com  $KIO_3$ , nos oito níveis de concentração (2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg de iodo por kg), sendo cada nível em três replicatas independentes, avaliadas segundo critério de aceitação da AOAC<sup>13,16</sup>.

O limite de repetibilidade foi obtido a partir do desvio-padrão dos resultados sob condições de repetibilidade (mesmos analistas, equipamentos e vidrarias, no mesmo dia), na concentração de 2 mg/kg, em sextuplicata. O limite de repetibilidade ( $r$ ) foi calculado pela Equação 6<sup>13,16</sup>.

$$r = t \times \sqrt{2} \times DP_r \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

$t$  = valor de  $t$  bicaudal com 95% de confiança e  $n-1$  graus de liberdade de acordo com a tabela de valores críticos para o teste  $t$ -Student

$DP_r$  = desvio-padrão da repetibilidade

O limite de repetibilidade visa capacitar o analista a decidir se a diferença entre análises em triplicata de uma amostra é significativa<sup>13,16</sup>.

#### Precisão intermediária

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, é reconhecida como a variabilidade mais representativa dos resultados em um mesmo laboratório. Refere-se à precisão avaliada em uma mesma amostra, amostra semelhante, utilizando o mesmo método, mas definindo exatamente quais as condições experimentais a variar. Por exemplo, analistas; instrumentos; tempos de análise, etc<sup>13</sup>.

Neste trabalho, a precisão intermediária foi avaliada por diferentes analistas, usando uma amostra de sal comercial com concentração de iodo aproximada de 28 mg/kg, mesmos instrumentos e condições de análise, em um mesmo dia. Os valores obtidos foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA)<sup>13,16</sup> fator único, com 95% de confiança, utilizando a ferramenta análise de dados do Microsoft Excel 2010.

#### Robustez

A capacidade do método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações nas condições analíticas representa a robustez, avaliada neste trabalho pelo teste de *Youden*<sup>13,16</sup>.

Este teste introduz várias mudanças de uma só vez, de tal maneira que os efeitos individuais podem ser verificados usando um limitado e razoável número de análises. Para a escolha dos fatores que deverão ser avaliados no estudo da robustez, é necessário conhecer o método, as características do analito e os pontos que podem apresentar variações, pois o principal objetivo da robustez é identificar fatores que devem ser cuidadosamente controlados e descobrir sobre quais circunstâncias são necessários cuidados especiais<sup>13,16</sup>.

O estudo da robustez foi realizado com duas amostras de sal, comerciais, com concentrações de iodo aproximadas de 27 mg/kg e 56 mg/kg, para avaliar e garantir que as condições estabelecidas no método e suas variações responderiam mesmo em sais com concentrações de iodo acima do limite superior permitido pela legislação de 45 mg/kg<sup>5</sup>.

Este teste consiste na análise multivariada de sete variáveis que podem influenciar no resultado analítico. As sete variáveis selecionadas foram: massa da amostra (V1); volume de solução de  $H_2SO_4$  0,5 M (V2); volume de solução de iodeto 1% (V3); volume de solução de amido 1% (V4); volume aproximado de solução de tiosulfato de sódio 0,005 M necessário para viragem no momento da adição da solução de amido (V5); tempo de dissolução (V6); tempo para titulação após adição de solução de iodeto (V7).

As condições nominais dos fatores foram denotados por letras maiúsculas A, B, C, D, E, F e G e seus valores alternativos pelas correspondentes letras minúsculas a, b, c, d, e, f e g.

A Tabela 1 apresenta a série de combinações fatoriais dos parâmetros para a execução do teste de *Youden*<sup>13,16</sup>. Um total de oito experimentos (I a VIII) foram conduzidos. Os resultados das análises são representados pelas letras s, t, u, v, w, x, y e z.

A partir dos resultados, o efeito de cada fator foi estimado pela diferença ( $\Delta$ ) entre a média dos resultados das quatro análises com letra maiúscula e a média dos resultados das quatro análises com letra minúsculas Equação 7<sup>13,16</sup>.

$$\Delta \frac{C}{c} = \text{Efeito de } \frac{C}{c} = \frac{s+u+w+y}{4} - \frac{t+v+x+z}{4} \quad (\text{Equação 7})$$

O cálculo do valor limite obedece à Equação 8<sup>13,16</sup>.

$$\text{Valor limite} = \frac{t \times DP}{\sqrt{2}} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

DP = Desvio-padrão de repetibilidade de seis resultados em condições nominais

$t = 2,571$  (valor de  $t$ -Student para 5 graus de liberdade e 95% de confiança)

Se a diferença das médias ( $\Delta$ ) para cada parâmetro, em módulo, for maior que o valor limite, conclui-se que o efeito em questão é estatisticamente significativo com 95% de confiança, ou seja, o fator analítico influencia no resultado final da análise<sup>13,16</sup>.



Tabela 1. Planejamento do teste de Youden para avaliação da robustez.

Fatores Analíticos	Variações dos fatores		Condição Experimental								Efeito
	Nominal	Alternativa	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
V1	10 g	20 g	A	A	A	A	a	a	a	a	A/a
V2	5 mL	4 mL	B	B	b	b	B	B	b	b	B/b
V3	10 mL	9 mL	C	c	C	c	C	c	C	c	C/c
V4	2 mL	1,5 mL	D	D	d	d	d	d	D	D	D/d
V5	1 mL	0,5 mL	E	e	E	e	e	E	e	E	E/e
V6	15 minutos	2 horas	F	f	f	F	F	f	f	F	F/f
V7	30 segundos	60 segundos	G	g	g	G	g	G	G	g	G/g
Resultado Observado			s	t	u	v	w	x	y	z	

Fatores: V1 = massa da amostra; V2 = volume de solução de  $H_2SO_4$  0,5 M; V3 = volume de solução de iodeto 1%; V4 = volume de solução de amido 1%; V5 = volume aproximado de solução de tiosulfato de sódio 0,005 M necessário para viragem, no momento da adição da solução de amido; V6 = tempo de dissolução; V7 = tempo para titulação após adição de solução de iodeto.

### Incerteza de medição

Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia<sup>17</sup>, a incerteza de uma medição é um parâmetro associado ao resultado, que caracteriza a dispersão dos valores obtidos em torno da média.

Resultados médios sem as respectivas incertezas carecem de significado porque não dão a informação completa sobre a medição. O resultado de uma medição é considerado como a melhor estimativa do valor do mensurando acompanhado de todas as fontes de incerteza que contribuem à propagação do mesmo<sup>18</sup>.

A expressão de resultados apenas como médias não permite a comparação com um valor de referência estabelecido, como um limite da legislação. Somente quando as médias estão acompanhadas de suas incertezas, é possível tomar decisões conclusivas, já que apresentam a variação admitida<sup>18</sup>.

A incerteza total é a soma das incertezas geradas pelos diferentes componentes do processo de medição. Através da combinação apropriada das variâncias, calcula-se a incerteza padrão combinada. Estabelecido um grau de confiança, determina-se a incerteza expandida utilizando um fator de abrangência  $k^{18,19,20}$ .

Neste trabalho, o cálculo da incerteza expandida foi gerado pelos componentes relacionados à concentração molar e volume da solução de tiosulfato de sódio, massa molar do iodo, massa da amostra e precisão intermediária.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seletividade

A Tabela 2 apresenta os resultados das médias da concentração de iodo experimental em oito níveis de fortificação tanto para o Grupo 1 (Água) quanto para o Grupo 2 (Água + Cloreto de sódio), com seus respectivos valores de desvios-padrão, desvio-padrão relativo, variância e recuperação. Nas triplicatas de cada nível de fortificação, pelo teste de Grubbs, não foi verificada a presença de valores aberrantes com 99% de confiança.

Na Figura 2, têm-se as equações  $y = 0,9848x - 0,0386$  (Grupo 1) e  $y = 0,9868x + 0,0584$  (Grupo 2) utilizadas no teste de comparação

de inclinação de retas de recuperação das concentrações teórica *versus* concentração experimental de iodo. Aplicando-se o teste t pareado para as inclinações das retas do Grupo 1 ( $b_1 = 0,9848$ ) e do Grupo 2 ( $b_2 = 0,9868$ ) com critério de aceitação de 95%, obteve-se t calculado (1,991) menor que o t tabelado (2,069), podendo-se concluir que  $b_1 = b_2$ , ou seja, coeficientes angulares das retas equivalentes, não havendo efeito de matriz.

Portanto, a seletividade foi confirmada pela homogeneidade das inclinações das curvas de recuperação de iodo, dos Grupos 1 e 2, consideradas estatisticamente iguais. Demonstrada a ausência de influência da matriz, utilizou-se os valores do Grupo 2 (água + cloreto de sódio +  $KIO_3$ ) para a avaliação dos demais parâmetros de validação, devido a melhor visualização do ponto de viragem da coloração violácea, em contraste com a coloração azulada apresentada pelo Grupo 1 (água +  $KIO_3$ ).

### Faixa de Trabalho e Linearidade

Na faixa de trabalho de 2 a 100 mg/kg de iodo estabelecida, segundo resultados apresentados na Tabela 2, verificou-se a ausência de valores discrepantes pelo teste de Grubbs, com 99% de confiança, para cada nível de concentração.

Na linearidade, pode-se verificar que o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi maior que 0,99, estabelecido pela ANVISA<sup>21</sup>, e 0,995 de acordo com o FDA<sup>22</sup>. A Figura 3A revela a linearidade do método para a faixa de trabalho de iodo estudada de 2 a 100 mg/kg, com equação da reta ( $y = 0,9868x + 0,0584$ ) e coeficiente de determinação  $r^2 = 0,99998$ . O comportamento homocedástico da curva na faixa de trabalho foi comprovado pelo teste de Cochran, onde o valor de C calculado (0,3136) foi menor que o C tabelado (0,6152), demonstrando variâncias equivalentes ao longo da faixa de trabalho.

A homocedasticidade dos dados também foi confirmada por meio do Gráfico de resíduos (concentração *versus* diferença entre a resposta observada e o valor predito calculado pela equação da reta de regressão), apresentado na Figura 3B, que possui distribuição aleatória em torno do zero, sem tendências, sendo independentes e não correlacionados, com pontos distribuídos aleatoriamente em torno do zero, demonstrando que o método dos mínimos quadrados utilizado para obtenção da equação da reta é adequado.

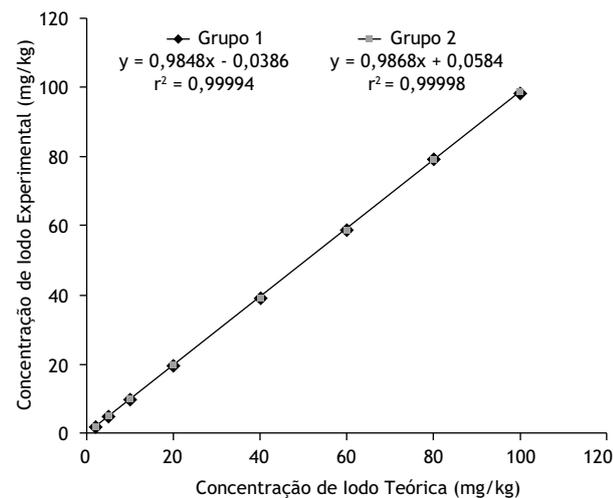


Figura 2. Comparação das curvas de recuperação das concentrações teórica e experimental de iodo para os Grupos 1 e 2.

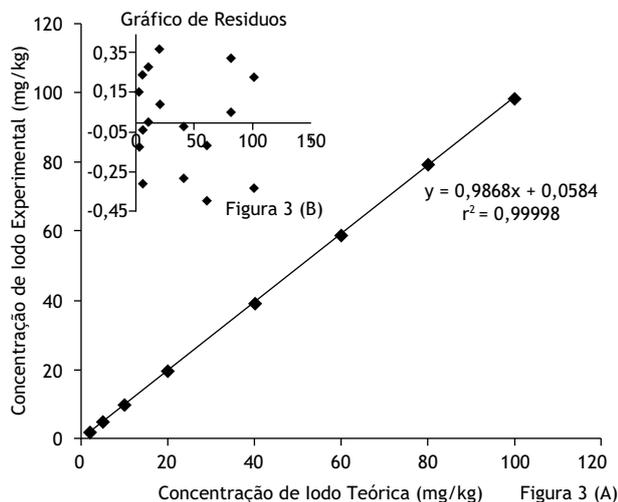


Figura 3. (A) Curva de regressão das concentrações teórica e experimental de iodo. (B) Gráfico de resíduos.

### Limites de Detecção e Quantificação

O LD realizado de forma visual revelou que a concentração de iodo de 1 mg/kg foi a menor concentração que gerou coloração e foi adotada como limite de detecção pelo critério visual.

A concentração de iodo de 2 mg/kg revelou DP = 0,14 e DPR = 7,15% nas seis replicatas realizadas, menor do que DPR de 8% estabelecido pela AOAC<sup>13,16,23</sup>, para concentração do analito de 1 ppm ou mg/kg, demonstrando precisão e exatidão aceitáveis. Utilizando-se o fator  $k = 10$  multiplicado pelo DP (0,145), obteve-se o LQ = 1,45, contudo optou-se por adotar 2 mg/kg como LQ.

O limite de detecção foi também calculado pelo desvio-padrão da concentração de iodo de 2 mg/kg (DP = 0,145), utilizando-se fator  $k = 3$ , resultando em LQ de 0,43 mg/kg, sendo desconsiderado por não ter sido confirmado experimentalmente.

### Exatidão

A Tabela 2 apresenta os valores de recuperação em porcentagem, do Grupo 2, para os 8 níveis de concentração de iodo, de 2 a 100 mg/kg. A recuperação variou de 98 a 101%, estando dentro do critério de aceitação, segundo AOAC<sup>13,16,23</sup>, de 80 a 110% estabelecido para a faixa de concentração do analito de 1 a 100 ppm (mg/kg).

### Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio dos valores de desvio-padrão relativo (DPR), apresentados na Tabela 2, para a faixa de concentração de iodo de 2 a 100 mg/kg, revelaram variação de 0,2 a 7,15%, demonstrando precisão do método conforme preconizado na AOAC<sup>13,16,23</sup>, que apresenta como critério de aceitação  $DPR \leq 8\%$ , para concentrações do analito de 1 a 100 ppm (mg/kg).

### Repetibilidade

O limite de repetibilidade ( $r$ ) foi calculado a partir do desvio-padrão na concentração de 2 mg/kg e foi estabelecido em 0,53 mg/kg. Desta forma, optou-se por adotar o valor de 0,55 mg/kg como a máxima diferença permitida entre as triplicatas, em amostras de rotina. Se a diferença encontrada for maior que o limite de repetibilidade ( $r$ ), os resultados apresentam diferença significativa, devendo ser descartados e a análise refeita<sup>13,16,23</sup>.

### Precisão Intermediária

O estudo da precisão intermediária foi realizado por três analistas diferentes, mesmos instrumentos e condições de análise, em um mesmo dia, utilizando uma amostra de sal comercial. Foram realizadas seis replicatas independentes por analista, totalizando 18 análises. As concentrações médias de iodo por analista foram 28,70 mg/kg (DP = 0,22; CV = 0,78%); 28,85 mg/kg, (DP = 0,24; CV = 0,82%); 28,68 mg/kg (DP = 0,22; CV = 0,78%) para os analistas 1, 2 e 3 respectivamente.

A avaliação dos resultados por análise de variância (ANOVA)<sup>13,16,23</sup> apresentou  $p = 0,41$ , isto é,  $p > 0,05$  revelando que não houve diferença significativa entre os analistas.

### Robustez

A Tabela 3 apresenta os resultados das combinações dos fatores avaliados nas condições nominais e alternativas, para sais com concentrações de iodo de 27 mg/kg e 56 mg/kg. Os valores limite foram 0,75 para 27 mg/kg e 0,44 para 56 mg/kg e os valores de efeito de cada fator apresentaram-se abaixo destes, indicando assim que não houve influência em nenhum fator estudado. O método demonstrou-se robusto mesmo em sais com concentração de iodo acima do limite superior permitido pela legislação.

## INCERTEZA DE MEDIÇÃO

O cálculo da incerteza expandida do teor de iodo em sal foi gerado após levantamento das fontes de incerteza para esta



Tabela 2. Médias das concentrações de iodo experimental, com seus respectivos desvios-padrão, desvio-padrão relativo, variância e recuperação, nos Grupos 1 e 2.

Concentração de iodo teórico (mg/Kg)	Concentração de iodo experimental <sup>a</sup> (mg/Kg)		Desvio-padrão		Desvio-padrão Relativo (%)		Variância		Recuperação (%)	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
2 <sup>b</sup>	2,02	2,02	0,14	0,14	7,15	7,15	0,0210	0,0210	101	101
5	5,06	4,97	0,16	0,28	3,19	5,53	0,0261	0,0756	101	99
10	10,03	10,03	0,16	0,16	1,61	1,61	0,0261	0,0261	100	100
20	19,52	19,98	0,16	0,16	0,80	0,81	0,0243	0,0261	98	100
40	39,41	39,32	0,16	0,16	0,40	0,40	0,0243	0,0243	98	98
60	58,84	59,03	0,48	0,16	0,81	0,27	0,2296	0,0261	98	98
80	78,91	79,10	0,42	0,16	0,54	0,20	0,1792	0,0243	99	99
100	97,97	98,71	0,32	0,32	0,32	0,33	0,1008	0,1045	98	98

Grupo 1: branco do ensaio (água) fortificado com iodato de potássio; Grupo 2: matriz sem analito (água+cloreto de sódio) fortificado com iodato de potássio. <sup>a</sup>Número de replicatas por nível de concentração: n = 3; <sup>b</sup>Número de replicatas: n = 6.

Tabela 3. Resultados do Teste de Youden para avaliação da robustez do método de iodo em sais comerciais com concentração de 27 e 56 mg/kg.

Fator	Concentração média				Valor Limite		Efeito
	27 mg/kg		56 mg/kg		27 mg/kg	56 mg/kg	
	Nominal	Alternativo	Nominal	Alternativo	0,75	0,44	
A/a	27,66	27,46	55,98	55,83	0,20	0,14	sem efeito
B/b	27,61	27,50	55,99	55,82	0,11	0,16	sem efeito
C/c	27,61	27,50	55,94	55,87	0,11	0,07	sem efeito
D/d	27,65	27,47	55,80	56,01	0,18	0,21	sem efeito
E/e	27,65	27,47	55,94	55,87	0,18	0,07	sem efeito
F/f	27,58	27,54	55,88	55,93	0,04	0,05	sem efeito
G/g	27,59	27,53	55,95	55,86	0,06	0,09	sem efeito

Fatores: A/a = massa da amostra; B/b = volume de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M; C/c = volume de solução de iodeto 1%; D/d = volume de solução de amido 1%; E/e = volume aproximado de solução de tiosulfato de sódio 0,005 M necessário para viragem no momento da adição da solução de amido; F/f = tempo de dissolução; G/g = tempo para titulação após adição de solução de iodeto.

determinação, relacionados aos componentes concentração molar e volume da solução de tiosulfato de sódio, massa molar do iodo, massa da amostra e precisão intermediária, apresentadas na Tabela 4, conforme o Guia Eurachem<sup>19</sup>.

A incerteza expandida foi calculada pela multiplicação do valor da incerteza combinada pelo fator de abrangência, k = 2,04, obtido utilizando a tabela de t Student com nível de confiança (95,45%) e o Veff (graus de liberdade efetivos) utilizando-se a Equação de Welch Sattethwaite (Equação 9)<sup>19</sup>.

$$V_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad \text{(Equação 9)}$$

Calculou-se a incerteza combinada para o teor de iodo estabelecido no limite máximo permitido na legislação em vigor, de 45 mg/kg. Para isto, foi necessário o cálculo da concentração real de iodo, conforme Equação 10.

$$C_{iodo} \text{ (mg/kg)} = \frac{(V_T \times C_{Na_2S_2O_3} \times MM_{iodo} \times 1000)}{m_a \times k} \times PI \quad \text{(Equação 10)}$$

Utilizando-se os valores dos componentes da fórmula, apresentados na Tabela 4, a concentração de iodo determinada foi de 45,41 mg/kg.

### Cálculo da incerteza combinada (u<sub>c</sub>)

A Equação 11 descreve o cálculo da incerteza combinada (u<sub>c</sub>)<sup>19</sup>, utilizando-se a incerteza padrão relativa de cada fonte de incerteza da Tabela 4.

$$\frac{u_c}{C_{iodo}} = \pm \sqrt{\left(\frac{u_{(V_T)}}{X_{(V_T)}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(C_{Na_2S_2O_3})}}{X_{(C_{Na_2S_2O_3})}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(MM_{iodo})}}{X_{(MM_{iodo})}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(m_a)}}{X_{(m_a)}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(PI)}}{X_{(PI)}}\right)^2} \quad \text{(Equação 11)}$$

Onde:

$u_{(V_T)} / X_{(V_T)}$  = incerteza padrão relativa do volume de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (mL)

$u_{(C_{Na_2S_2O_3})} / X_{(C_{Na_2S_2O_3})}$  = incerteza padrão relativa da concentração molar Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (mol/L)

$u_{(MM_{iodo})} / X_{(MM_{iodo})}$  = incerteza padrão relativa da massa molar iodo (g/mol)

$u_{(m_a)} / X_{(m_a)}$  = incerteza padrão relativa da massa da amostra (g)

$u_{(PI)} / X_{(PI)}$  = incerteza padrão relativa da precisão intermediária

Substituindo-se pelos valores das incertezas padrão relativa relacionados na Tabela 4, temos:

$$\frac{u_c}{C_{iodo}} = \pm \sqrt{(0,0035729)^2 + (0,0049262)^2 + (0,0000001)^2 + (0,0000168)^2 + (0,0079)^2}$$

$$u_c = \pm 0,0099721 \times 45,41$$

$$u_c = \pm 0,4527956 = \pm 0,45$$



Tabela 4. Fontes de incerteza para o cálculo da incerteza combinada e incerteza expandida na determinação de iodo em sal.

Fontes de incerteza	Grandeza (x)	Incerteza Padrão $u(x)$	Incerteza Padrão Relativa $u_r = u(x)/x$	Graus de liberdade	Porcentagem de contribuição	
$V_T$	Volume de $Na_2S_2O_3$ (mL)	4,10	0,014649	0,0035729	infinito	21,765
$C_{Na_2S_2O_3}$	Concentração molar $Na_2S_2O_3$ (mol/L)	0,005236	0,000026	0,0049262	Infinito	30,008
$MM_{\text{iodo}}$	Massa molar iodo (g/mol)	126,90	0,000017	0,0000001	Infinito	0,001
$m_a$	Massa da amostra (g)	10,0000	0,000168	0,0000168	Infinito	0,103
PI	Precisão Intermediária	1	0,007900	0,0079000	17	48,124

### Cálculo da incerteza expandida (U)

A Equação 12 descreve o cálculo da incerteza expandida (U)<sup>19</sup>.

$$U = u_c \times \text{Fator de abrangência (k)} \quad (\text{Equação 12})$$

$$U = 0,45 \times 2,06$$

$$U = 0,93 \text{ mg/kg}$$

Resultado final:  $45,41 \pm 0,93 \text{ mg/kg}$

$$U \text{ (em porcentagem)} = 2\%$$

O estudo mostrou que o desempenho do método foi adequado para determinação de iodo, na forma de iodato, em sal, com limite de detecção de 1 mg/kg, limite de quantificação de 2 mg/kg com DPR de 7,15%, faixa linear de trabalho de 2 a 100 mg/kg, linearidade  $r^2$  de 0,99998, recuperação de 98 a 101%, limite de repetibilidade de 0,55 mg/kg, precisão intermediária com  $p = 0,41$  sem diferença significativa entre analistas, robustez com efeitos inferiores aos valores limite de 0,75 para sais com 27 mg/kg e 0,44 para sais com 56 mg/kg e definido o valor da incerteza de medição de 0,93 mg/kg, com nível de confiança (95,45%).

Alguns trabalhos na literatura descrevem estudos da determinação de iodo em sal, utilizando técnicas instrumentais, como Cromatografia líquida de alta resolução com detector de arranjo de diodos<sup>24</sup>, Espectrofotometria com sistemas de análise por injeção em fluxo<sup>25</sup> e Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES)<sup>26</sup>, como métodos alternativos ao método de titulação iodométrica abordado neste trabalho. Muitos desses métodos necessitam de instrumentos mais onerosos, demandam mais treinamento e tempo para realizar as determinações.

Estes trabalhos não possuem todos os parâmetros de validação de acordo com orientações do INMETRO<sup>13</sup>. São citadas algumas informações sobre o desempenho do método, como limites de

detecção na faixa de 3,7  $\mu\text{g/L}^{24}$ , 0,02  $\text{mg/L}^{25}$  e 3,55  $\text{mg/kg}^{26}$ , sendo que os dois primeiros valores estão inferiores ao encontrado neste estudo, entretanto, tratam-se de métodos instrumentais e cujas concentrações estão expressas em unidades de massa/volume. As porcentagens de recuperação correspondentes encontram-se na faixa de 98,4%, 97,3 a 100,1% e 104,9 a 112,6%, respectivamente. As primeiras porcentagens de recuperação estão próximas às encontradas neste trabalho, entretanto, as recuperações referentes à técnica de Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES)<sup>26</sup>, indicam a possibilidade de erros sistemáticos positivos, apesar de estar dentro da faixa de tolerância adotada de 80 a 120%. A precisão destes métodos, avaliada pelo desvio-padrão relativo (DPR %), foi de 7,9%<sup>24</sup>, 1,2%<sup>25</sup> e de 7,7 a 25,3%<sup>26</sup>. Alguns autores relatam, inclusive, a interferência da matriz, cujas quantidades de cloreto, sódio e potássio influenciam demasiadamente nos resultados. Nenhum destes trabalhos apresentou o valor da incerteza de medição.

O emprego destes equipamentos tornam estas metodologias menos acessíveis para uso no monitoramento do sal com a finalidade de estudos epidemiológicos.

### CONCLUSÃO

O desempenho do método para a determinação de iodo em sal, adicionado na forma iodato de potássio, por titulação iodométrica, revelou seletividade, boa exatidão, precisão e robustez. A linearidade, faixa de trabalho, limites de detecção, quantificação e a incerteza de medição estabelecidos foram adequados para os teores de iodo normalmente encontrados nas amostras de sal avaliadas nos programas de monitoramento nacional, comprovando a confiabilidade dos resultados analíticos. A documentação destas informações ora inexistente será de grande valia para a comunidade científica e estará contribuindo para tomadas de decisões importantes em Vigilância Sanitária e Saúde Pública.

### REFERÊNCIAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC n° 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial União. 26 dez. 2003;Seção 1:33.
2. Iodine Global Network. FAQs about Iodine Nutrition. 2012 [acessado 1 maio 2012]. Disponível em: <http://www.iccid.org/p142000264.html>
3. Ministério da Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Manual técnico e operacional do pró-iodo: programa nacional para a prevenção e controle dos distúrbios por deficiência de iodo. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2008. (Série A. Normas e manuais técnicos).
4. Laurberg P, Cerqueira C, Ovesen L, Rasmussen LB, Perrild H, Andersen S. Iodine intake as a determinant of thyroid disorders in populations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010;24(1):13-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2009.08.013>



5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC n° 23, de 24 de abril de 2013. Dispõe sobre teor de iodo no sal destinado a consumo humano. Diário Oficial União. 25 abr. 2013;Seção 1:55.
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC n° 130, de 26 de maio de 2003. Estabelece a iodação do sal considerado próprio para consumo. Diário Oficial da União. 28 maio 2003;Seção 1:48.
7. Formenti L. Anvisa defende redução do teor de iodo no sal. Estado São Paulo. 8 jul. 2011 [acessado 1 maio 2012]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping\\_08072011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping_08072011.pdf)
8. Iodine Global Network. Iodate or Iodide? 2013 [acessado 22 nov 2013]. Disponível em: <http://www.iccid.org/p142000383.html>
9. AOAC International. AOAC 925.56-1925: Iodine in iodized salt: titrimetric method. Washington, DC: AOAC International; 2006.
10. Sullivan KM, Houston R, Gorstein J, Cervinkas J, eds. Monitoring universal salt iodisation programmes. Atlanta: International Council for Control of Iodine Deficiency; 1995.
11. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4a ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2005.
12. Karmarkar MG, Pandav CS, Krishnamachari KAVR. Principle and procedure for iodine estimation: a laboratory manual. New Delhi: Indian Council of Medical Research; 1986.
13. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia- INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos: revisão 4. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia; 2011. (DOQ-CGCRE-008).
14. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas; 2005.
15. Souza SVC. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: Delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos [tese de doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
16. Instituto Adolfo Lutz. Validação ou verificação de métodos químicos quantitativos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2013. (P-SG-034).
17. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia- INMETRO. VIM. Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia - VIM: Portaria Inmetro 029 de 1995. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia; 2003.
18. Chui QSH; Zucchini RR; Lichtig J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. Quim Nova. 2001;24(3):374-80. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422001000300014>
19. Ellison, SLR, Rosslein M, Williams A, eds. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. Helsinki: Eurachem; 2000. (Eurachem/Citac Guide CG4)
20. International Standard Organization - ISO. Guide to the expression of uncertainty in measurement. Geneva: International Standard Organization; 1995.
21. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE n. 475, de 19 de março de 2002. Diário Oficial União. 2 jun. 2003.
22. Ora Laboratory Procedure Food and Drug Administration. Methods, method verification and validation ORA-LAB.5.4.5. Silver Spring: U. S. Food and Drug Administration; 2003 [acessado 9 ago 2012]. Disponível em: <http://www.fda.gov/ScienceResearch/FieldScience/ucm171877.htm>
23. AOAC International. Official methods of analysis. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. Washington: AOAC; 2012 [acessado 9 ago 2012]. Disponível em: [http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf)
24. Gupta M, Pillai AKKV, Singh A, Jain A, Verma KK. Salt-assisted liquid-liquid microextraction for the determination of iodine in table salt by high-performance liquid chromatography-diode array detection. Food Chem. 2011;124(4):1741-6.
25. Shabani AMH, Ellis PS, McKelvie ID. Spectrophotometric determination of iodate in iodised salt by flow injection analysis. Food Chem. 2011; 129:704-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.116>
26. Oliveira AA, Nóbrega JA, Pereira-Filho ER. Avaliação de ICP OES com configuração axial ou radial para determinação de iodo em sal de cozinha. Quim Nova. 2012;35(7):1299-305. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000700004>



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.  
Para ver uma cópia desta licença, visite [http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt\\_BR](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR).