

Fabiana Della Betta

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO RÁPIDO  
PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE NITRATO E  
NITRITO EM ALIMENTOS INFANTIS UTILIZANDO  
ELETROFORESE CAPILAR**

Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa.

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Vitali.

**FLORIANÓPOLIS  
2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Della Betta, Fabiana

Desenvolvimento e validação de método rápido para  
determinação simultânea de nitrato e nitrito em alimentos  
infantis utilizando eletroforese capilar / Fabiana Della  
Betta ; orientadora, Ana Carolina de Oliveira Costa ; co-  
orientadora, Luciano Vitali. - Florianópolis, SC, 2014.  
82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Eletroforese Capilar de  
Zona. 3. Validação Analítica. 4. Preparo de Amostra. 5.  
Alimentos Infantis. I. de Oliveira Costa, Ana Carolina .  
II. Vitali, Luciano. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos  
Alimentos. IV. Título.

Fabiana Della Betta

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO RÁPIDO  
PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE NITRATO E  
NITRITO EM ALIMENTOS INFANTIS UTILIZANDO  
ELETROFORESE CAPILAR**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 14 de Fevereiro de 2014.

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Roseane Fett  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Carolina de Oliveira Costa, Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC)

---

Prof. Dr. Luciano Vitali, Coorientador  
Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC)

---

Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto  
Universidade Federal de Santa Catarina (CCS/UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Carmem Maria Olivera Müller  
Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC)

---

Dr. Heitor Daguer  
Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA)



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as experiências que me permitiu viver, pelas adversidades, as quais me fizeram mais forte e me fizeram valorizar ainda mais as conquistas ao longo desta caminhada.

Aos meus pais Antonio e Lareci, minha irmã Adriane e meu cunhado Vanilson, pelo apoio, carinho, dedicação. Vocês são meu exemplo de vida!

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa pela oportunidade de realizar este trabalho, por ter me acolhido como sua orientada, pela amizade, paciência e dedicação. Sou muito grata pela oportunidade.

Ao meu coorientador Prof<sup>o</sup> Dr. Luciano Vitali, pelo apoio e pelos ensinamentos.

Aos meus orientadores da graduação Juliano De Dea Lindner e Liziane Schittler por me ajudaram na decisão de seguir a carreira acadêmica.

Aos meus colegas do Laboratório de Química de Alimentos, pela amizade e companheirismo, que fazem meu dia a dia muito mais agradável.

A minha família de Floripa: Fabíola, Priscila, Paulo, Maria Laura e aos meninos, sou muito grata por Deus ter colocado vocês na minha vida, o que tornou mais especial esta caminhada.

A todos os meus amigos e amigas em especial a Daniela, Aline, Fabiane, Beatriz e Daiane, que mesmo de longe sempre me mandam boas vibrações.



*“Todo mundo é um gênio. Mas, se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em uma árvore, ele vai passar toda a sua vida acreditando que é estúpido”.*

*(Albert Einstein)*





DELLA BETTA, Fabiana. **Desenvolvimento e validação de método rápido para determinação simultânea de nitrato e nitrito em alimentos infantis utilizando eletroforese capilar**. 2014. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

## RESUMO

Este estudo propõe um método rápido e inovador para determinação simultânea de nitrato e nitrito em amostras de alimentos infantis utilizando eletroforese capilar de zona (CZE) com um procedimento simples de preparo de amostra. As condições de preparo de amostra foram otimizadas a partir de planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central. O eletrólito de corrida foi constituído por 10 mmol  $L^{-1}$  de ácido perclórico e 40 mmol  $L^{-1}$   $\beta$ -alanina, pH 3,96, selecionados com o auxílio do *software Peakmaster*<sup>®</sup>. As separações foram realizadas em um capilar de sílica fundida (32 cm x 8,5 cm x 50  $\mu$ m d.i.) com amostras e padrões injetados hidrodinamicamente (50 mbar/3 s) pela extremidade do capilar mais próxima do detector, com tensão de -30 kV e detecção direta em 210 nm, utilizando tiocianato como padrão interno (I. S.). O método proposto foi validado e posteriormente aplicado na análise de quatorze amostras de alimentos infantis. Uma das amostras analisadas atingiu níveis de nitrato superior ao permitido pela legislação brasileira (250 mg  $kg^{-1}$ ) e em todas, a concentração de nitrito estava abaixo do limite de detecção. O bom desempenho analítico verificado para este método indica que este pode ser considerado adequado para implementação em laboratórios de rotina e fiscalização, como alternativa ao método normalizado da AOAC.

**Palavras-chave:** Eletroforese capilar de zona. Método rápido. Preparo de amostra. Validação analítica. Alimentos infantis.



## ABSTRACT

This study proposes a fast and innovative method for simultaneous nitrate and nitrite determination in baby food samples by capillary zone electrophoresis (CZE) with a simple sample preparation procedure. The sample preparation procedure was optimized using factorial design  $2^3$  with triplicate on the central point. The background electrolyte was composed of 10 mmol L<sup>-1</sup> perchloric acid and 40 mmol L<sup>-1</sup> β-alanine at pH 3.96, the conditions were chosen with *Peakmaster*<sup>®</sup> software. Separations were conducted in an uncoated fused-silica capillary (32 cm × 50 μm i.d.), standards and samples were introduced with hydrodynamic pressure (50 mbar/ 3 s) into the capillary using the short-end injection, separation voltage applied was -30 kV and direct UV detection set at 210 nm, thiocyanate was used as internal standard (I.S.). The proposed method was validated and applied for analysis of fourteen baby food samples. One sample had nitrate levels above that permitted by Brazilian legislation (250 mg kg<sup>-1</sup>) and in all samples the nitrite concentrations were under the limit of detection. The good analytical performance verified for this method indicates that it is suitable for implementation in food laboratories for the routine determination of nitrate and nitrite as an alternative to the AOAC official method.

**Keywords:** Capillary zone electrophoresis. Fast method. Sample preparation. Analytical validation. Baby food.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar.....	27
Figura 2 - Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal (a) e curva de mobilidade do EOF em função do pH para um capilar de sílica fundida (b). Eletrólitos com força iônica cerca de 20 mmol L <sup>-1</sup> ..	29
Figura 3 - Curva de mobilidade efetiva dos analitos versus pH.....	53
Figura 4 - Otimização do BGE empregando o <i>software PeakMaster</i> ® fixando a concentração de β-alanina (20 mmol L <sup>-1</sup> ) e variando a concentração de ácido perclórico (2,5-25 mmol L <sup>-1</sup> ). (a) Parâmetros do eletrólito. (b) mobilidade efetiva e EMD <i>versus</i> concentração de ácido perclórico.....	54
Figura 5 - Eletroferograma da separação dos analitos. (a) simulação utilizando o <i>software PeakMaster</i> ® e (b) em solução padrão. Legenda: 1 – nitrato; 2 – nitrito. Condições de separação: 10 mmol L <sup>-1</sup> de ácido perclórico e 40 mmol L <sup>-1</sup> de β-alanina, pH 3,96, injeção 50 mbar, 3 s, -30 kV, 32 cm (8,5 cm × 50 μm d.i. × 375 μm d.e.), detecção direta em 210 nm.....	56
Figura 6 - Diagrama de Pareto resultante do planejamento fatorial utilizando na otimização do procedimento de preparo de amostra.....	58
Figura 7 - Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva aquosa.....	60
Figura 8 - Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva de matriz.....	63
Figura 9 - Seletividade simulada no <i>software PeakMaster</i> ®. Legenda: (1) nitrato; I.S; (2) nitrito; (3) brometo; (4) oxalato; (5) sulfito. Condições de separação simuladas: 10 mmol L <sup>-1</sup> de ácido perclórico e 40 mmol L <sup>-1</sup> de β-alanina, pH 3,96, injeção 50 mbar, 3 s, -30 kV, 32 cm (8,5 cm × 50 μm d.i. × 375 μm d.e.), detecção direta em 210 nm.....	67
Figura 10 - Eletroferograma da separação dos analitos em (a) solução padrão (b) alimento orgânico à base de abóbora; (c) Alimento à base de frango e vegetais. Onde: (1) nitrato; (I.S.) tiocianato; (2) nitrito. Condições de separação: 10 mmol L <sup>-1</sup> de ácido perclórico e 40 mmol L <sup>-1</sup> de β-alanina, pH 3,96, injeção 50 mbar, 3 s, -30 kV, 32 cm (8,5 cm × 50 μm d.i. × 375 μm d.e.), detecção direta em 210 nm.....	74



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo estimado de nitrato e nitrito em alguns vegetais utilizados como ingredientes em formulações de alimentos infantis. ...	23
Tabela 2 - Composição das amostras de alimentos infantis utilizadas no estudo. ....	42
Tabela 3 - Composição das amostras de alimentos infantis utilizadas no estudo. ....	43
Tabela 4 - Composição das amostras de alimentos infantis utilizadas no estudo. ....	44
Tabela 5 – Planejamento fatorial $2^3$ com ponto central empregado na otimização do preparo de amostras de alimentos infantis para determinação simultânea de nitrato e nitrito utilizando CZE. ....	45
Tabela 6 - Parâmetros analíticos e variações para avaliação do parâmetro robustez do método para determinação de nitrato e nitrito em amostras de alimentos infantis. ....	50
Tabela 7 - Delineamento experimental empregado no teste de <i>Youden</i> . ....	50
Tabela 8 - Resultados de normalidade teste de Shapiro-Wilk para curva aquosa. ....	61
Tabela 9 - Resultados de homoscedasticidade teste de Cochran para curva aquosa. ....	61
Tabela 10 - Valores de <i>F</i> para verificação do ajuste ao modelo linear para curva aquosa. ....	62
Tabela 11 - Resultados de normalidade teste de Shapiro-Wilk para curva de matriz. ....	64
Tabela 12 - Resultados de homoscedasticidade teste de Cochran curva de matriz. ....	64
Tabela 13 - Valores de <i>F</i> para verificação do ajuste ao modelo linear das curvas de matriz. ....	65
Tabela 14 - Verificação do efeito de matriz através do teste <i>t-Student</i> . ....	66
Tabela 15 - Precisão intra e inter-ensaio para nitrato e nitrito em amostras de alimentos infantis. ....	68
Tabela 16 - Médias de recuperação aparente para nitrato e nitrito em amostras de alimentos infantis, em diferentes níveis de concentração. ....	69
Tabela 17 - Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o nitrato. ....	71
Tabela 18 - Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o nitrito. ....	72

Tabela 19 - Determinação de nitrato e nitrito em alimentos infantis. ... 75



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$	Mobilidade eletroforética
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of analytical communities</i>
BGE	Eletrólito de corrida (do inglês, “background electrolyte”)
CE	Eletroforese capilar (do inglês, “capillary electrophoresis”)
CGE	Eletroforese capilar em gel (do inglês, “capillary gel electrophoresis”)
CIEF	Focalização isoeétrica capilar (do inglês, “capillary isoelectric focusing”)
CITP	Isotacoforese capilar (do inglês, “capillary isotachopheresis”)
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio (do inglês, “cetyl trimethylammonium bromide”)
CV	Coefficiente de variação
CZE	Eletroforese capilar de zona (do inglês, “capillary zone electrophoresis”)
d. i.	Diâmetro interno
DAD	Detector de arranjo de diodos
DDAB	Brometo de dodecildimetilamônio (do inglês, “dodecyl dimethylammonium bromide”)
EMD	Migração por eletrodispersão (do inglês, “electromigration dispersion”)
EOF	Fluxo eletrosmótico (do inglês, “electroosmotic flow”)
HIBA	ácido 2-hidroxi-isobutírico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, “high performance liquid chromatography”)
I.S.	Padrão interno (do inglês, “internal standard”)
IC	Cromatografia iônica (do inglês, “ion chromatography”)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LOD	Limite de detecção (do inglês, “limit of detection”)

LOQ	Limite de quantificação (do inglês, “limit of quantification”)
MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar (do inglês “micellar electrokinetic chromatography”)
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês, “Relative standard deviation”)
TRIS	tris-hidroximetilaminometano
UE	União Europeia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
2.1 ALIMENTOS INFANTIS E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE NITRATO E NITRITO .....	22
2.2 MÉTODOS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM ALIMENTOS .....	25
2.3 ELETROFORESE CAPILAR.....	26
<b>2.3.1 Eletroforese capilar aplicada à determinação de ânions</b> .....	<b>31</b>
<b>2.3.2 Aplicação de eletroforese capilar na determinação de nitrato e nitrito em alimentos</b> .....	<b>32</b>
2.4 PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRA .....	34
2.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	35
<b>2.5.1 Conformidade do sistema</b> .....	<b>36</b>
<b>2.5.2 Linearidade</b> .....	<b>36</b>
<b>2.5.3 Efeito de matriz</b> .....	<b>37</b>
<b>2.5.4 Seletividade</b> .....	<b>37</b>
<b>2.5.5 Precisão</b> .....	<b>38</b>
<b>2.5.6 Exatidão</b> .....	<b>38</b>
<b>2.5.7 Limite de detecção e limite de quantificação</b> .....	<b>39</b>
<b>2.5.8 Robustez</b> .....	<b>39</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	40
<b>3.1.1 Objetivos específicos</b> .....	<b>40</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
4.1 REAGENTES E PADRÕES .....	41
4.2 INSTRUMENTAL.....	41
4.3 AMOSTRAS .....	42
4.4 PREPARO DE AMOSTRA .....	45
4.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	46
<b>4.5.1 Conformidade do sistema</b> .....	<b>46</b>
<b>4.5.2 Linearidade</b> .....	<b>46</b>
<b>4.5.3 Efeito de matriz</b> .....	<b>47</b>
<b>4.5.4 Seletividade</b> .....	<b>48</b>
<b>4.5.5 Precisão</b> .....	<b>48</b>
<b>4.5.6 Exatidão</b> .....	<b>48</b>
<b>4.5.7 Limites de detecção e quantificação</b> .....	<b>49</b>

<b>4.5.8 Robustez</b> .....	<b>49</b>
4.6 DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM ALIMENTOS INFANTIS.....	51
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
5.1 OTIMIZAÇÃO DO ELETRÓLITO DE CORRIDA .....	52
5.2 PLANEJAMENTO FATORIAL APLICADO À EXTRAÇÃO DE NITRATO E NITRITO .....	57
5.3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	59
<b>5.3.1 Conformidade do sistema</b> .....	<b>59</b>
<b>5.3.2 Linearidade</b> .....	<b>59</b>
<b>5.3.3 Efeito de matriz</b> .....	<b>62</b>
<b>5.3.4 Seletividade</b> .....	<b>66</b>
<b>5.3.6 Exatidão</b> .....	<b>68</b>
<b>5.3.7 Limites de detecção e quantificação</b> .....	<b>69</b>
<b>5.3.8 Robustez</b> .....	<b>70</b>
5.4 DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM ALIMENTOS INFANTIS.....	73
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>78</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nitrato e nitrito apresentam-se de forma natural em muitos vegetais utilizados como ingredientes de formulações de alimentos infantis. Devido aos aspectos toxicológicos relacionados à intoxicação aguda com nitrito, da qual o principal grupo de risco são crianças menores de um ano de idade, é importante monitorar as concentrações desses íons nas formulações destinadas ao público infantil (CHAN, 2011; GREER; SHANNON, 2005).

Os métodos para determinação de nitrato e nitrito são baseados em métodos clássicos de análise que, na maioria dos casos, envolvem processos demorados, com baixa sensibilidade, exatidão, precisão e robustez. Ainda, requererem elevada quantidade de materiais de laboratório, na maioria das vezes os reagentes utilizados são conhecidamente tóxicos e/ou corrosivos, o que é um risco, tanto para o analista quanto para o meio ambiente, caso os resíduos gerados não sejam devidamente tratados (DELLA BETTA et al., 2014).

As desvantagens apresentadas pelo método normalizado comumente utilizado para a determinação de nitrato e nitrito em alimentos demonstram a necessidade de metodologias menos laboriosas, com maior confiabilidade, alta frequência analítica e que proporcionem menor geração de resíduos.

As técnicas analíticas modernas empregam equipamentos que permitem alta sensibilidade, velocidade e elevada frequência analítica e se apresentam como uma alternativa aos métodos clássicos. Dentre essas técnicas, a eletroforese capilar tem se destacado nas últimas décadas, pois apresenta potencial para fornecer separações com elevada eficiência, boa resolução, tempos de análise apreciavelmente curtos, total automatização, baixo custo operacional e reduzida geração de resíduos (TAVARES, 1996).

Com o advento da tecnologia, a maior exigência do mercado consumidor e os cuidados com a segurança alimentar, é necessário que as legislações sejam aperfeiçoadas e que novos métodos sejam incluídos, a fim de prover maior confiabilidade aos resultados e processos mais simples para utilização em laboratórios de rotina, nos quais a demanda por análises é crescente.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ALIMENTOS INFANTIS E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE NITRATO E NITRITO

Durante a infância o aleitamento materno é a principal fonte de nutrientes. Entretanto, a partir dos quatro meses de vida é admissível empregar os chamados alimentos de transição como uma forma de substituir gradualmente a amamentação (PANDELOVA et al. 2012). A Portaria n° 34, de 13 de janeiro de 1998 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) define os alimentos de transição como os alimentos industrializados para uso direto ou empregado em preparado caseiro, utilizados como complemento do leite materno ou de leites modificados introduzidos na alimentação de lactentes e crianças de primeira infância. Os alimentos de transição ainda têm por objetivo promover uma adaptação progressiva aos alimentos comuns, e de tornar essa alimentação balanceada e adequada às suas necessidades, respeitando-se sua maturidade fisiológica e seu desenvolvimento neuropsicomotor (BRASIL, 1998).

Essa portaria também classifica as formulações quanto à forma de apresentação, a saber: (i) sopinha quando se tratar de formulação salgada; (ii) papinha quando se tratar de sobremesa; (iii) purê para complementos de refeições salgadas e (iv) suquinho quando for alimento líquido a base de suco de frutas e ou hortaliças e ou cereais. Dentre os ingredientes permitidos estão leite e derivados, carnes e peixes, óleos e gorduras vegetais, frutas, hortaliças, leguminosas e tubérculos.

Os vegetais apresentam-se como uma importante fonte de nutrientes à dieta infantil, mas também são uma fonte natural de nitrato e nitrito (CHAN, 2011), metabólitos resultantes da absorção de nitrogênio. Muitas plantas acumulam nitrato em suas raízes e partes aéreas quando excedem suas necessidades metabólicas. O acúmulo de nitrato ocorre majoritariamente nas folhas, por isso os vegetais folhosos tendem a ter maiores níveis de nitrato do que frutos, sementes e tubérculos (BLOM-ZANDSTRA, 1989; SINDELAR; MILKWOSKI, 2012). O acúmulo de nitrato depende de fatores ambientais como: quantidade e forma de aplicação de nitrogênio; exposição solar; temperatura e quantidade de água (PARDO-MARÍN et al., 2010).

O nitrito também pode estar presente na natureza, porém em menor concentração, uma vez que resulta da redução do nitrato (MERUSI et al., 2010). A Tabela 1 apresenta a título ilustrativo os teores aproximados de nitrato e nitrito em alguns vegetais utilizados em preparações infantis.

Tabela 1 - Conteúdo estimado de nitrato e nitrito em alguns vegetais utilizados como ingredientes em formulações de alimentos infantis.

<b>Vegetal</b>	<b>Nitrato (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Nitrito (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Beterraba</b>	1680-3590	2,1-29,8
<b>Espinafre</b>	535-3660	0,0-12,9
<b>Alface</b>	347-1080	0,0-1,7
<b>Repolho</b>	193-976	0,0-12,6
<b>Banana</b>	88-214	0,0-9,5
<b>Vagem</b>	165-611	0,0-2,5
<b>Rabanete</b>	764-2500	0,0-1,0
<b>Brócolis</b>	29-1140	0,01-9,5
<b>Cenoura</b>	920-1950	0,02-0,03
<b>Berinjela</b>	250-424	0,07-0,49

Fonte: Adaptado de Sindelar; Milkowski, 2012; Hord, Tang, Bryan, 2009;

O nitrato pode ser excretado na urina sem causar efeitos adversos, mas sob condições de pH baixo e ação de bactérias redutoras pode ser reduzido a nitrito, e este levar ao desenvolvimento de metemoglobinemia. Essa síndrome é causada pelo aumento da concentração de metemoglobina no sangue, devido à oxidação da hemoglobina a metemoglobina, composto incapaz de transportar o oxigênio no sangue. Esta doença é particularmente perigosa para crianças menores de 6 meses, podendo ser fatal principalmente em crianças recém-nascidas. Nesse último caso, as crianças não possuem o sistema imunológico completamente desenvolvido e por isso não produzem a enzima metemoglobina reductase em quantidade suficiente para converter a metemoglobina novamente a hemoglobina (AVERY, 1999; CAMMACK et al., 1999; CHAN, 2011; MCMULLEN et al. 2005).

Em crianças maiores e nos adultos a redução do nitrato ocorre na cavidade bucal e no estômago, diferente dos recém-nascidos onde a

redução ocorre no intestino, uma vez que o pH gástrico é geralmente mais elevado o que favorece o desenvolvimento de bactérias capazes de reduzir nitrato a nitrito (GREER; SHANNON, 2005).

A literatura reporta alguns casos de metemoglobinemia associados ao consumo de vegetais por crianças menores de dois anos. Na cidade de Pamplona na Espanha foram registrados no período de 1987 a 2010, 78 casos de metemoglobinemia relacionados à ingestão de alimentos com elevadas concentrações de nitrito. Neste estudo os autores verificaram fortes indícios de que as crianças afetadas haviam consumido preparações caseiras de purês à base vegetais com concentrações elevadas de nitrato, que após o preparo foram mantidos sob refrigeração até 48 horas (MARTINEZ et al., 2013).

Entre os anos de 1993 e 1998 também na Espanha, sete crianças com idade entre sete e treze meses foram diagnosticadas com metemoglobinemia, sendo todos os casos atribuídos ao consumo de preparações caseiras à base de vegetais, consumidas de 12 até 27 horas após o preparo (SANCHEZ-ECHANIZ; BENITO-FERNÁNDEZ; MINTEGUI-RASO, 2001). Na Itália, Savino e colaboradores (2006) também reportaram casos de metemoglobinemia em crianças menores de seis meses de idade atribuídas ao consumo de formulações caseiras à base de vegetais, neste caso sopa de abobrinha.

A legislação brasileira estabelece que o conteúdo de nitrato em formulações infantis prontas para o consumo não deve exceder 250 mg kg<sup>-1</sup>. Esta legislação também indica que produtos que contêm espinafre e beterraba, vegetais que apresentam elevados teores de nitrato (Tabela 1) devem apresentar no rótulo a advertência em destaque e em negrito "Contém espinafre e/ou beterraba. Não pode ser consumido por menores de seis meses de idade" (BRASIL, 1998). Para Greer e Shannon (2005) o consumo de alguns vegetais como vagem, cenoura, abóbora, espinafre e beterraba, deve ser evitado por crianças menores de três meses, devido à presença de altas concentrações de nitrato.

Outra importante questão relacionada à saúde na alimentação de adultos e crianças envolvendo nitrito é o seu potencial para formação de compostos carcinogênicos derivados dos nitritos, os compostos N-nitrosos. Estes compostos são formados pela nitrosação de amins primárias e secundárias. O principal agente nitrosante é o ácido nitroso gerado a partir do nitrito (MAGEE, 1982). Vários estudos têm demonstrado os efeitos carcinogênicos, citotóxicos, mutagênicos e



teratogênicos dos compostos N-nitrosos (FERGUSON, 2010; MAGEE, 1982; PETERS et al., 1994).

Assim, apesar de o aleitamento materno ser recomendado como melhor fonte de nutrientes para crianças menores de seis meses de idade, cada vez mais as mães têm optado por alimentar seus filhos com formulações infantis industrializadas, por isso é importante que haja efetivo controle de qualidade na composição e um controle rigoroso dos teores de nitrato e nitrito nessas formulações de modo a não representar um risco à saúde.

## 2.2 MÉTODOS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM ALIMENTOS

O método 993.03 da AOAC é considerado um método normalizado para determinação de nitrato em alimentos infantis. Esse método envolve a redução do nitrato à nitrito pela reação com cádmio esponjoso, seguido da determinação colorimétrica de nitrito em espectrofotômetro a 540 nm (AOAC, 2005). A determinação de nitrito é semelhante à determinação do nitrato, exceto pela reação envolvendo o cádmio.

Nesse método, as medidas de absorvância das amostras realizadas no espectrofotômetro para determinação de nitrato e nitrito são simples e rápidas. Entretanto, para isso ser possível e os resultados obtidos apresentarem o mínimo de interferências, o preparo das amostras é laborioso e complexo, sendo essa a principal desvantagem desse método. Um elaborado preparo de amostra é necessário devido a baixa seletividade da espectrofotometria. Os detalhes das etapas envolvidas no preparo de amostras pelo método da AOAC serão discutidos mais adiante.

Nos últimos anos, diversas técnicas vêm sendo utilizadas na determinação de nitrato e nitrito, dentre os quais se destacam a análise por injeção em fluxo acoplado à espectrofotometria (AHMED et al., 1996; ANDRADE et al., 2003; RUIZ-CAPILLAS; ALLER-GUIOTE; JIMENEZ-COLMENERO, 2007), potenciometria (PÉREZ-OLMOS et al., 1997), voltametria (SANTOS et al., 2009), cromatografia iônica (MCMULLEN et al., 2005), e eletroforese capilar (JASTRZĘBSKA, 2010; JOHNS et al., 2004; MERUSI et al., 2010; ÖZTEKIN; NUTKU; ERIM, 2002).

Das técnicas citadas, a eletroforese capilar (CE, do inglês, “capillary electrophoresis”) apresenta potencial para desenvolver métodos para determinação simultânea de cátions e ânions em curtos tempos de separação. Características essas não observadas nas demais técnicas o que faz da CE uma ferramenta importante a ser explorada para o desenvolvimento de novos métodos de análise rápida de nitrato e nitrito.

### 2.3 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis quando submetidos a um campo elétrico (TAVARES, 1996). Durante a aplicação de uma diferença de potencial as espécies iônicas migram a uma dada velocidade e direção determinadas pela sua massa e carga (LANDERS, 2008).

Em CE, a separação é conduzida em tubos de dimensões capilares, preenchidos com eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico. O uso do capilar oferece muitas vantagens sobre os outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel, papel, etc). Devido a fatores geométricos (a relação entre a área superficial interna e volume apreciavelmente grande), um capilar possibilita a dispersão eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (Efeito Joule). Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 1000 V/cm), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede  $10^5$  pratos teóricos), e tempos de análise apreciavelmente curtos. Outras vantagens da CE são: a reduzida demanda de amostra, com volumes tipicamente na ordem de 1 a 10 nL, e a possibilidade de injeção e detecção em fluxo (TAVARES, 1997).

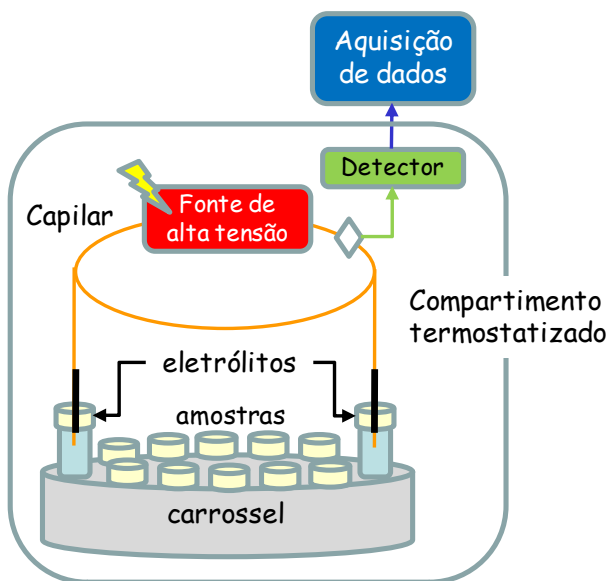
Existem vários modos de separação em eletroforese capilar, dos quais podemos destacar: eletroforese capilar de zona (CZE), eletroforese capilar em gel (CGE), focalização isoelétrica capilar (CIEF), cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), isotacoforese capilar (CITP). Cada modo de separação apresenta mecanismos característicos que permitem a separação diferencial dos analitos de interesse (SKOOG; HOELER; NIEMAN, 2002).

A CZE tem mostrado ser útil para a separação de diversos compostos, em que o capilar é preenchido com eletrólito de corrida

(BGE), geralmente com característica tamponante. A amostra é introduzida em uma das extremidades do capilar e um campo elétrico é aplicado, fazendo com que os diferentes componentes iônicos da mistura migrem de acordo com sua própria mobilidade (direção e velocidade) determinada pela sua massa e carga (LANDERS, 2008; SKOOG; HOELER; NIEMAN, 2002). A CZE é um modo usado para análises de íons inorgânicos, moléculas pequenas, proteínas e carboidratos.

A instrumentação em CE é bastante simples e o sistema consiste basicamente em uma fonte de alta tensão, tubos capilares, eletrodos, geralmente de platina e um detector, como mostra a Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar.



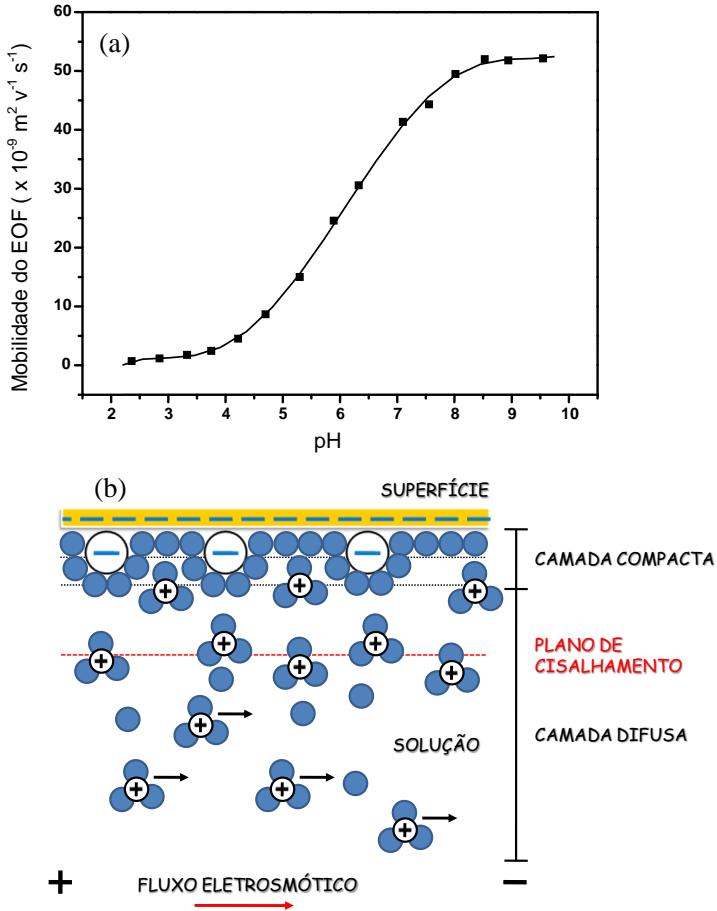
Fonte: Adaptado de Costa, 2009.

Como mostra a representação, a fonte de alta tensão é conectada através dos eletrodos a dois reservatórios que contêm solução de eletrólito e pode ser operada à voltagem e/ou corrente constante, com voltagem podendo variar de -30 a +30 kV e a corrente de 0 a 200  $\mu$ A (TAVARES, 1996). Pelo capilar, aplica-se uma corrente de alta tensão

que faz com que os analitos se movam entre os polos positivo e negativo, chegando ao detector que conectado a um computador fornece os resultados da análise na forma de eletroferograma. É nos tubos capilares onde ocorre a separação dos analitos. Estes capilares normalmente são fabricados com sílica fundida, material este que fornece maleabilidade, possui alta constante dielétrica, baixa condutividade elétrica alta transmitância óptica entre 190 a 900 nm. A fonte de alta tensão é conectada através dos eletrodos a dois reservatórios que contem BGE. Os reservatórios posicionados na entrada e/ou saída do capilar podem conter BGE, amostra ou outras soluções pertinentes ao método de separação proposto, podendo ser facilmente trocados. O sistema de detecção amplamente utilizado em CE é absorção na região UV-Vis devido à facilidade de implementação deste dispositivo e aplicabilidade. O computador, através de um *software*, permite a seleção e controle dos parâmetros do sistema, além da aquisição e tratamento de dados.

Os tubos capilares são responsáveis pelo surgimento de um fenômeno a ser considerado nas separações por CE, denominado fluxo eletrosmótico (EOF). A sílica fundida é composta por grupamentos silanol, que apresentam caráter levemente ácido ( $pK_a \sim 4 - 6$ ). Dependendo do pH do BGE estes grupamentos se ionizam, tornando a superfície negativamente carregada e liberando íons  $H^+$  para o seio da solução que preenche o capilar. Quando da tensão elétrica é aplicada, os íons positivamente carregados movimentam-se em direção ao cátodo e ao migrarem induzem o surgimento de um fluxo de líquido no capilar, denominado EOF. Um esquema representando a ocorrência do EOF está mostrado na Figura 2-a. A presença deste fenômeno pode contribuir para melhorar a resolução de separação de compostos empregando a técnica (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997; SILVA, et al. 2007; TAVARES, 1996).

Figura 2 - Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal (a) e curva de mobilidade do EOF em função do pH para um capilar de sílica fundida (b). Eletrólitos com força iônica cerca de 20 mmol L<sup>-1</sup>.



Fonte: Adaptado de COSTA, 2009.

Existem duas formas de introdução de amostras em CE: injeção eletrocinética e injeção hidrodinâmica. Na injeção eletrocinética, aplica-se uma diferença de potencial entre os reservatórios de amostra e eletrólito por determinado tempo, então a amostra é transferida para dentro do capilar, devido à combinação da velocidade eletroforética e eletrosmótica. Uma limitação deste tipo de injeção é que a quantidade de amostra introduzida no sistema é muitas vezes pouco representativa. Já na injeção hidrodinâmica utiliza-se uma diferença de pressão como mecanismo de introdução da amostra e neste caso é possível uma amostragem representativa, além de apresentar maior reprodutibilidade que a injeção eletrocinética (HARRIS, 2008; SILVA et al., 2007; TAVARES, 1996).

Um dos parâmetros mais importantes no desenvolvimento de métodos por CE é a composição do BGE. De acordo com Xiong e Li (1999) a escolha do BGE não é uma escolha arbitrária, deve levar em consideração vários fatores, entre eles, o modo de separação, o modo de detecção (direto ou indireto), a compatibilidade entre as condições de separação e detecção, capacidade tamponante, seletividade da separação, detecção e efeitos de matriz. Por isso o desenvolvimento do eletrólito adequado pode ser relativamente complexo. Por exemplo, em um método de separação por CZE, as características de um bom eletrólito de corrida incluem boa capacidade tamponante no pH escolhido, seleção de co e contra-íon a fim de minimizar a assimetria dos picos, não apresentar absorvidade na mesma região dos analitos, ter baixa condutividade elétrica e mobilidade efetiva próxima aos analitos, para não provocar alargamento dos picos (TAVARES, 1997; VITALI; FÁVERE; MICKE, 2011).

O modo de detecção mais empregado em CE é absorção molecular na região do ultravioleta e/ou visível (UV/VIS). Para analitos que possuem grupos cromóforos, a detecção é feita de forma direta, pela medida da absorção dos íons quando esses passam pelo detector. Para compostos que não possuem grupos cromóforos, ou que possuem baixa absorvidade molar sem derivatização, a medida não é baseada na absorção dos íons da amostra diretamente. Neste caso, um cromóforo iônico é adicionado ao eletrólito e o detector recebe um sinal contínuo devido à presença deste composto. Ao passar pelo detector, o analito desloca os íons deste cromóforo, de modo que o sinal de fundo diminui durante a passagem de sua banda, ou seja, a detecção do analito baseia-

se na diminuição da absorvância do composto cromóforo (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; XIONG; LI, 1999).

Quando comparada à cromatografia de troca iônica (outra técnica de separação de íons), a CE apresenta inúmeras vantagens. A cromatografia de troca iônica usando detecção de condutividade, também conhecida como cromatografia iônica (IC), é uma técnica que tem algumas limitações em relação ao elevado custo e a baixa durabilidade das colunas de separação, pois a fase móvel geralmente é fortemente ácida ou alcalina, os efeitos de matriz também são comuns, o que requer etapas adicionais de preparo de amostra. A CE é uma técnica com menor custo, maior velocidade de separação e melhor resolução quando comparada com a cromatografia de troca iônica (HEIGER; WEINBERGER, 2012; RHEMREV-BOOM, 1994). Outra característica da CE é a possibilidade de determinar analitos catiônicos e aniônicos simultaneamente, diferente da cromatografia de troca iônica (BRIÔNE et al., 2007). Além disso, a CE permite separações com elevada resolução, alta velocidade, utilizando reduzidos volumes de amostra (ordem de nanolitros para injeção), gerando quantidades de resíduos igualmente reduzidos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Devido às características implícitas à técnica, a CE tem sido empregada na determinação de cátions e ânions em várias matrizes alimentares, como por exemplo, vegetais (FUKUSHI et al, 1997), vinhos (ROVIO; SIRÉN; SIRÉN, 2011), água (MOTELLIER; PETIT; DECAMBOX, 2000), açúcares (MERUSI et al., 2010) e produtos cárneos (PEREIRA; PETRUCI; CARDOSO, 2012).

### **2.3.1 Eletroforese capilar aplicada à determinação de ânions**

A migração eletroforética dos ânions é sempre dirigida ao polo positivo. Quando a separação de ânions é conduzida sob EOF normal e a mobilidade do EOF for menor que a mobilidade dos ânions, a resultante da mobilidade do ânion é a diferença entre sua mobilidade e a mobilidade do EOF. Nesse caso, a polaridade do sítio de injeção dos ânions deve ser negativa. Assim, ânions maiores e, portanto, mais lentos, chegam no detector depois dos ânions mais rápidos, pois migram contra o EOF em direção ao eletrodo de carga oposta, ou seja, positivamente carregado. Quando os ânions são separados sob EOF normal e a mobilidade do EOF for maior que a mobilidade dos ânions, aqueles com menor mobilidade são conduzidos pelo EOF até o detector

antes dos que tem maior mobilidade, desde que sejam injetados no polo de carga positiva. Outra situação ocorre quando o EOF é invertido pela adição de um modificador da parede do capilar. Nesse caso tanto o EOF quanto os ânions migram na mesma direção, possibilitando a detecção quando injetados no polo negativo (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997; MERUSI et al., 2010). Visto que o EOF afeta amplamente a determinação de ânions é necessário seu controle e, este pode ser feito através de variações no pH, incorporação de aditivos ao BGE, entre outros.

Em separações de ânions por CE, o BGE afeta a simetria da banda. Diferenças muito pronunciadas entre as mobilidades do analito e do co-íon componente do eletrólito geram bandas distorcidas. Quando a mobilidade do co-íon do eletrólito é muito maior que a mobilidade do analito, o pico resultante apresenta uma cauda, já quando a mobilidade do co-íon é muito menor que a mobilidade do analito, forma-se uma cauda frontal. Mas esses efeitos podem ser facilmente contornados pela escolha adequada do co-íon do BGE. Segundo Merusi et al. (2010) CE vem demonstrando ser uma técnica poderosa para determinação de ânions, uma vez que permite análises rápidas e baixos custos operacionais.

### **2.3.2 Aplicação de eletroforese capilar na determinação de nitrato e nitrito em alimentos**

A aplicação de métodos utilizando CE na determinação de nitrato e nitrito em alimentos ainda é pouco explorada, pois estes analitos são comumente determinados por métodos espectrofotométricos.

Öztekin, Nutku e Erim (2002) desenvolveram um método para determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos e vegetais empregando CZE com modo de detecção direto. O capilar empregado foi revestido com poliéter imida, a fim de inverter o EOF. O BGE foi constituído por 20 mmol L<sup>-1</sup> de tris-hidroximetilaminometano (TRIS), e o padrão interno (I. S.) escolhido foi o tiocianato. O método proposto permitiu tempos de separação menores que 3 minutos e o limite de detecção (LOD) foi 0,105 e 0,099 mg L<sup>-1</sup>, para nitrito e nitrato, respectivamente.

Johns e colaboradores (2004) desenvolveram um método para determinação simultânea de ânions (cloreto, bromato e nitrato) e cátions (lítio, magnésio, sódio, cálcio, potássio e amônio) empregando CE com



fluxo eletrosmótico anódico com alta magnitude. O BGE foi composto por 6 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol, 12 mmol L<sup>-1</sup> de ácido 2-hidroxi-isobutírico (HIBA), 0,1 mmol L<sup>-1</sup> de brometo de dodecildimetilamônio (DDAB) e 2 mmol L<sup>-1</sup> de éter coroa (1,4,7,10,13,16-hexa-oxaciclo-octadecano) em pH 4, com modo de detecção indireto. A separação ocorreu em menos de 4 minutos, os LOD para os cátions variaram de 0,92 a 5,65 μmol L<sup>-1</sup> e para os ânions de 6,66 a 11,43 μmol L<sup>-1</sup>.

Para determinar nitratos, nitritos e oxalatos em amostras de vegetais, açúcar e fibras dietéticas, Merusi e colaboradores. (2010) desenvolveram um método de CE no qual o BGE foi composto por tampão fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup> a pH 2,5 e detecção direta. A separação foi conduzida em menos de 4 minutos, os LOD foram 0,3, 0,8 e 4,5 mg L<sup>-1</sup> para nitrato, nitrito e oxalato, respectivamente. Os limites de quantificação (LOQ) foram 0,5 mg L<sup>-1</sup> para o nitrato, 1,6 mg L<sup>-1</sup> para o nitrito e 14 mg L<sup>-1</sup> para os oxalatos.

Oliveira e colaboradores (2012) desenvolveram método utilizando CZE com detecção direta para análise simultânea de nitrato e nitrito em amostras de água de abastecimento. O BGE otimizado consistiu de 100 mmol L<sup>-1</sup> de TRIS/HCl e 0,15 mmol L<sup>-1</sup> de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) em pH 8,2. A separação dos analitos ocorreu em menos de 3 minutos. Os LOD e LOQ obtidos para o método foram na ordem de μg L<sup>-1</sup>.

Pereira, Petrucci e Cardoso (2012) desenvolveram um método em CZE com modo de detecção direto para determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos comercializados no mercado brasileiro. O I. S. escolhido pelos autores foi o sulfito, e o BGE consistiu em uma mistura de tetraborato de sódio (60 mmol L<sup>-1</sup>) e CTAB 0,2 mmol L<sup>-1</sup> para inversão do EOF. O método desenvolvido permitiu a separação dos compostos em menos de 5 minutos, com LOD para nitrato e nitrito foram 0,17 e 0,15 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, e LOQ para nitrato e nitrito foram 0,56 e 0,49 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A literatura mostra o potencial apresentado pela CE na determinação de sais de nitrato e nitrito em matrizes alimentares. Sua detectabilidade satisfatória, possibilidade de reduzidos tempos de análise, resolução e baixo custo operacional, tornam esta técnica promissora e de grande utilidade em laboratórios de análise de rotina e fiscalização.

## 2.4 PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRA

O método 933.03 da AOAC é considerado método normalizado para determinação de nitrato em alimentos infantis, e baseia-se na extração dos íons nitrato em água quente, adição de tetraborato de sódio e sulfato de zinco para precipitação das proteínas. Depois da etapa de extração a amostra é resfriada até temperatura ambiente, filtrada e parte da solução resultante é tratada com cádmio esponjoso para redução de nitrato a nitrito, em seguida o nitrito é então determinado espectrofotometricamente através de reação colorimétrica com ácido sulfanílico e cloreto de alfa-naftilenodiamina (AOAC, 2005). A determinação de nitrito é semelhante, com exceção da etapa envolvendo o cádmio.

O método normalizado para estas determinações apresenta diversas desvantagens, entre elas, a demanda de longos tempos para análise, principalmente na etapa de preparo de amostra (tempo superior a 3 horas), utiliza grande quantidade de materiais de laboratório, grande volume de reagentes e conseqüentemente gera elevados volumes de resíduos. Além de expor o analista a riscos, devido à utilização de cádmio, metal conhecidamente tóxico que é carcinogênico e pode causar danos a vários órgãos (AL-ASSAF et al., 2013).

Devido às dificuldades implícitas às determinações empregando os métodos oficiais de análise, há um crescente interesse por procedimentos alternativos que reduzam e facilitem as operações de preparo de amostras, que utilizem reagentes menos tóxicos e que gerem menos resíduos. Por isso muitas metodologias de análise ao serem desenvolvidas buscam não só a melhoria do método, mas também redução nas etapas envolvendo o preparo de amostra.

A literatura mostra que o preparo de amostra para determinação de nitrato e nitrito é conduzida majoritariamente através de extração dos analitos com água quente, seguido de desproteíntização. McMullen e colaboradores (2005), por exemplo, determinaram nitrato e nitrito em diferentes amostras de alimentos infantis utilizando cromatografia iônica, o procedimento de preparo de amostra consistiu na extração dos analitos com água quente, agitação, desproteíntização com acetonitrila, centrifugação, diluição, seguida de filtração e injeção. Resultando em recuperações que variaram de 87 a 104%.

Para determinar nitrato e nitrito a partir de CZE em amostras de vegetais Merusi et al. (2010) conduziram a extração com água quente

(100°C) sob agitação por 15 minutos, a solução foi filtrada, e não foi necessária etapa adicional de desproteinização. O preparo de amostra mostrou-se eficiente demonstrando bons resultados de recuperação (90-109%).

Pereira, Petrucci e Cardoso (2012) determinaram nitrato e nitrito em embutidos cárneos, com a extração dos analitos em água quente (80°C), homogeneização durante 2 minutos e um segundo aquecimento da amostra a 80°C, desta vez durante 1 hora. Após a extração a amostra foi filtrada, diluída e encaminhada para injeção em equipamento de CE. Os valores de recuperação de nitrato e nitrito na amostra variaram de 96,9 a 101,9%, mostrando que o método empregado foi eficiente para a extração dos compostos da matriz estudada.

O preparo da amostra é normalmente uma etapa limitante da maioria das determinações, pois longos tempos de preparo diminuem a frequência analítica. Por isso os métodos de extração são exaustivamente estudados, a fim de reduzir os tempos de preparo de amostra e o consumo de reagentes, mas sem comprometer os resultados de recuperação.

## 2.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação de um método é o processo no qual se determina que o mesmo seja adequado para os propósitos para que se destina (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998). Por isso, novos métodos devem ser validados antes de serem implantados em análises de rotina, de modo a garantir a veracidade dos resultados obtidos. Porém a validação de um método analítico não é uma tarefa simples, pois requer um grande número de experimentos analíticos e cálculos estatísticos (HARRIS, 2008).

Existem dois tipos de validação, a validação em laboratório (do inglês *in house validation*) e a validação completa (do inglês *full validation*). No primeiro caso a validação é avaliada dentro de um único laboratório, porém sem levar em consideração o parâmetro reprodutibilidade, por isso muitas vezes este tipo de validação é considerada uma etapa preliminar nos estudos de validação. Já a validação completa envolve todos os parâmetros de desempenho, além de ser comum o uso de estudos interlaboratoriais para estabelecer a reprodutibilidade e a incerteza associada ao método e só assim pode ser

aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Existem vários protocolos de validação de métodos analíticos entre eles EURACHEM, INMETRO, MAPA e ANVISA. Nos estudos de validação podem ser avaliados vários parâmetros, entre eles a seletividade, linearidade, exatidão, precisão, robustez, limite de detecção e quantificação.

### **2.5.1 Conformidade do sistema**

O teste conformidade do sistema deve ser realizado antes de procedimentos de validação ou análise de amostras a fim de comprovar a adequação do sistema de análise ao utilizá-lo e garantir que este é adequado para produzir resultados com exatidão e precisão aceitáveis (HUND et al., 2002; BRISCOE; STILES; HAGE, 2007). Alguns protocolos de validação não contemplam este parâmetro, no entanto julga-se importante garantir que o sistema de análise fornecerá dados confiáveis.

### **2.5.2 Linearidade**

Uma faixa de trabalho validada consiste no intervalo de concentração no qual a linearidade, a exatidão e a precisão são aceitáveis. Para Thompson, Ellison e Wood (2002) as curvas de calibração devem ser construídas em triplicata, possuir seis ou mais pontos distribuídos de forma equidistante, com concentrações menores e maiores que o valor esperado, além de ser recomendado que a concentração da amostra fique próxima ao ponto central da faixa de trabalho.

A linearidade é definida como a capacidade de um método analítico produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração (INMETRO, 2007). Muitas vezes este parâmetro é erroneamente determinado através dos coeficientes de correlação ( $r$ ) e determinação ( $R^2$ ). Entretanto estes coeficientes por si só não são suficientes para garantir o ajuste da curva ao modelo linear, pois modelos com alto resíduo ou pontos mal distribuídos também podem fornecer bons coeficientes de correlação e determinação (RIBEIRO et al., 2008; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) é uma das ferramentas estatísticas mais aceitas para avaliar a linearidade. A análise do gráfico dos resíduos permite detectar problemas de ajuste da curva, como os desvios da linearidade. Em uma curva bem ajustada os resíduos devem estar dispostos de forma aleatória em torno do zero, ter variância constante (homoscedasticidade) e ausência de valores discrepantes (BUSSAB; MORETTIN, 2010).

### **2.5.3 Efeito de matriz**

O efeito de matriz é definido como uma mudança no sinal analítico causado por componentes da amostra diferentes do analito. A matriz pode conter diversos componentes que interferem no desempenho da medição e estes interferentes podem agir aumentando ou reduzindo o sinal analítico (INMETRO, 2007). Para avaliação do efeito de matriz em amostras desconhecidas, complexas, e na ausência de amostras brancas, o método mais indicado é a adição de padrão (HARRIS, 2008).

A avaliação do efeito de matriz deve ser conduzida de forma semelhante ao procedimento para construção da curva em solução padrão, respeitando as mesmas concentrações, diluições e na mesma faixa de trabalho. A curva de calibração em matriz deve ser avaliada quanto ao parâmetro linearidade, e caso este seja confirmado, faz-se a comparação entre as inclinações das curvas em solução padrão e em curva de matriz a fim de comparar se existe diferença significativa entre si, caso não isso não se comprove, pode-se dizer que a matriz não afeta o ensaio (TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

### **2.5.4 Seletividade**

Um método é considerado seletivo quando produz respostas para vários analitos, porém é capaz de distinguir e detectar com exatidão o analito de interesse na presença de interferentes (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

### 2.5.5 Precisão

O parâmetro precisão é definido como a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A precisão é expressa em termos do coeficiente de variação (CV) e pode ser estimada como repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2007).

A repetibilidade ou precisão intra-ensaio permite verificar a variabilidade a ser esperada quando um método é executado por um único analista, em um único laboratório, utilizando a mesma instrumentação. A precisão intermediária, ou precisão inter-ensaio, mostra a variabilidade da precisão de experimentos conduzidos em um mesmo laboratório por diferentes analistas, ou em dias diferentes, ou em equipamentos diferentes. Enquanto que a reprodutibilidade avalia-se a precisão dos resultados obtidos para uma determinada análise seguindo a mesma metodologia, mas variando sempre que possível os operadores, os instrumentos, entre outros fatores experimentais (EURACHEM, 1998; RIBEIRO et al. 2008).

Os parâmetros de medida do CV dependem da técnica empregada, para CE, por exemplo, recomendam-se os parâmetros tempo de migração e área do pico. Quanto maior o CV menor é a precisão da medida (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998).

### 2.5.6 Exatidão

A exatidão é definida como a concordância entre o valor medido no ensaio e o valor aceito como referência (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). A avaliação deste parâmetro pode ser conduzida através de comparações interlaboratoriais, ensaios de recuperação ou ainda utilização de materiais de referência certificados, (INMETRO, 2007). Dentre esses os testes de recuperação são mais comuns devido à maior simplicidade. O uso de materiais de referência é limitado muitas vezes pelo custo elevado e menor disponibilidade.

Os testes de recuperação são conduzidos pela estimativa de quantidades conhecidas de analito adicionadas a uma amostra, e podem ser avaliados em três níveis de concentração: próximo ao LOD; próximo à concentração média da faixa de trabalho; próximo ao ponto máximo da faixa de trabalho. Essa forma de recuperação também é conhecida

como recuperação aparente e apresenta limitações uma vez que o analito adicionado, não está na amostra da mesma forma, e sim de uma forma mais facilmente detectável (INMETRO, 2007). Para Ribeiro et al. (2008) a exatidão pode ser determinada também pela comparação dos resultados obtidos os resultados de uma segunda metodologia, que seja bem estabelecida.

### **2.5.7 Limite de detecção e limite de quantificação**

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento, o sinal é medido, mas ainda é muito pequeno para ser uma medida exata. Já o limite quantificação (LOQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão, correspondendo a um sinal dez vezes maior que a relação sinal/ruído (INMETRO, 2007; HARRIS, 2008).

### **2.5.8 Robustez**

A robustez é a capacidade de um método resistir a pequenas variações deliberadamente feitas nos parâmetros analíticos sem alterar significativamente sua exatidão e precisão. Um método robusto é aquele que se mostra praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer enquanto este esteja sendo executado (HARRIS, 2008; RIBEIRO et al., 2008).

O INMETRO (2007) recomenda o teste de *Youden* para verificação da robustez de um método analítico, pois este teste permite determinar os parâmetros que têm a maior influência sobre o resultado final da análise e obter um controle mais rigoroso das variações nestes parâmetros que podem ocorrer durante a análise de rotina, além de ordenar a influência de cada variável nos resultados.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e validar um método rápido para preparo de amostras e determinação simultânea de nitrato e nitrito em alimentos infantis utilizando CZE.

##### 3.1.1 Objetivos específicos

- Definir a composição do eletrólito de corrida e avaliação dos demais parâmetros instrumentais inerentes à técnica, utilizando *software* de simulação em CE, para desenvolver um método rápido de separação e determinação simultânea de nitrato e nitrito;
- Otimizar um procedimento de extração de nitrato e nitrito usando planejamento experimental, visando minimizar o consumo de reagentes e reduzir também o tempo necessário para o preparo das amostras a serem analisadas;
- Validar a metodologia proposta contemplando a avaliação dos parâmetros de desempenho: linearidade, efeitos de matriz, seletividade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação;
- Analisar amostras comerciais de alimentos infantis quanto ao conteúdo de nitrato e nitrito.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES E PADRÕES

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água desionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Padrões de nitrito de sódio, bem como tiocianato de potássio (pureza > 99%) foram adquiridos junto a Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido perclórico (70%) e a  $\beta$ -alanina (> 99%) utilizados foram da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, CO, E.U.A.). As soluções padrões de nitrato, nitrito e tiocianato ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) e as soluções de ácido perclórico e  $\beta$ -alanina ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foram preparadas diariamente e armazenadas a  $4^\circ\text{C}$  até o momento da análise. Outros reagentes utilizados durante o experimento foram hidróxido de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e acetonitrila (Merck, Rio de Janeiro, Brasil).

### 4.2 INSTRUMENTAL

Os experimentos foram conduzidos em sistema de eletroforese capilar modelo 7100 da marca Agilent Technologies (Palo Alto, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), controlador de temperatura e programa de aquisição e tratamento de dados fornecido pelo fabricante (*HP ChemStation*<sup>®</sup>).

Antes do primeiro uso o capilar foi condicionado com  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH (30 min) e água desionizada (30 min). No início de cada dia, o capilar foi condicionado por método de lavagem com  $1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH (15 min) seguido de água desionizada por 15 minutos e com solução de eletrólito de corrida (15 min). Entre as corridas, o capilar foi lavado com o eletrólito por 1 minuto, e no final de cada dia, fez-se lavagem com  $1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH (10 min) e água (10 min).

As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida de 32 cm, sendo 8,5 cm comprimento efetivo,  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno (d.i.) e  $375 \mu\text{m}$  de diâmetro externo da marca Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, EUA.), modo de detecção direto em 210 nm e a temperatura mantida a  $25^\circ\text{C}$ . As amostras e os padrões foram introduzidos pela extremidade mais curta do capilar (*outlet*) com pressão hidrodinâmica de 50 mbar por 3 s. A tensão utilizada na separação foi -30 kV (polaridade negativa no local de injeção).

O BGE usado no método proposto foi composto por ácido perclórico 10 mmol L<sup>-1</sup> e β-alanina 40 mmol L<sup>-1</sup> em pH 3,96, tiocianato foi utilizado como I.S. na concentração final de 25 mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.3 AMOSTRAS

Quatorze amostras de alimentos infantis de duas diferentes marcas (A – amostras orgânicas,  $n= 2$ ; B – amostras tradicionais,  $n= 12$ ) foram adquiridas em supermercados da cidade de Florianópolis (SC) e mantidas sob refrigeração até o momento das análises. Os principais ingredientes das formulações foram batata, abóbora, cenoura, beterraba, espinafre, banana, carne e frango.

Tabela 2 - Composição das amostras de alimentos infantis utilizadas no estudo.  
(continua)

Amostra	Ingredientes
<b>Alimento à base de vegetais</b>	Água, batata, peito de frango, abobrinha, cebola, mandioquinha, óleo de canola, farinha de arroz, óleo de milho, amido, sal com reduzido teor de sódio, alho e fumarato ferroso.
<b>Alimento à base de carne e legumes</b>	Batata, água, cenoura, carne, mandioquinha, cebola, óleo de canola, farinha de arroz, óleo de milho, amido, polpa de tomate, e sal.
<b>Alimento à base de banana e leite</b>	Banana, água, fórmula infantil de seguimento (leite desnatado, maltodextrina, oleína de palma, óleo de palmiste, óleo de canola, água, óleo de milho, sulfato ferroso, sulfato de zinco, sulfato de cobre, iodeto de potássio, lecitina de soja, vitamina A, D, E, K, C, B1, B2, niacina, vitamina b6, ácido fólico, ácido pantotênico, vitamina b12 e biotina), suco de uva branca, amido, leite em pó, óleo de milho e canola, carbonato de cálcio, vitamina c e acidulante ácido cítrico.

Tabela 3 - Composição das amostras de alimentos infantis utilizadas no estudo.  
(continuação)

<b>Amostra</b>	<b>Ingredientes</b>
<b>Alimento orgânico à base de macarrão e vegetais</b>	Macarrão orgânico, água, abóbora orgânica, batata orgânica, milho, brócolis, caldo desidratado de verduras sem sal.
<b>Alimento orgânico à base de abóbora</b>	Abóbora orgânica, batata orgânica, água, milho e sal.
<b>Alimento à base de carne e vegetais</b>	Batata, cenoura, água, carne, brócolis, cebola, polpa de abóbora, óleo de canola, óleo de milho, farinha de arroz, polpa de tomate, amido e sal.
<b>Alimento à base de hortaliças e frango</b>	Batata, peito de frango, água, couve, espinafre, cebola, óleo de canola, farinha de arroz, óleo de milho, amido e sal. 'Contém espinafre. Não pode ser consumido por menores de 3 meses de idade.'
<b>Alimento à base de beterraba</b>	Batata, água, mandioquinha, feijão, cebola, polpa de tomate, cenoura, óleo de canola, óleo de milho, polpa de abóbora, amido, beterraba, farinha de arroz e sal. Não contém glúten. 'Contém beterraba. Não pode ser consumido por menores de 3 meses de idade.'
<b>Alimento à base de frango e vegetais</b>	Batata, peito de frango, cenoura, água, frango, polpa de abóbora, cebola, chuchu, amido, óleo de canola, óleo de milho, farinha de arroz, sal e antioxidante ácido ascórbico.

Tabela 4 - Composição das amostras de alimentos infantis utilizadas no estudo.  
(conclusão)

<b>Amostra</b>	<b>Ingredientes</b>
<b>Alimento à base de carne, legumes e macarrão</b>	Batata, carne, cenoura, água, polpa de abóbora, cebola, óleo de canola, polpa de tomate, macarrão, óleo de milho, amido e sal.
<b>Alimento à base de legumes e carne</b>	Batata, cenoura, carne, água, cebola, polpa de abóbora, óleo de canola, chuchu, óleo de milho, farinha de arroz, amido e sal.
<b>Alimento à base de gema de ovos, carne e vegetais</b>	Batata, água, cenoura, carne, polpa de abóbora, cebola, farinha de arroz, óleo de canola, gema de ovo, amido, polpa de tomate, óleo de milho, e sal.
<b>Alimento à base de peru, vegetais e arroz</b>	Batata, cenoura, carne, água, cebola, polpa de abóbora, óleo de canola, chuchu, óleo de milho, farinha de arroz, amido e sal.
<b>Alimento à base de frango, vegetais e macarrão</b>	Batata, água, peito de frango, cenoura, brócolis, polpa de abóbora, cebola, macarrão, óleo de canola, óleo de milho, amido e sal.

Fonte: próprio autor.

#### 4.4 PREPARO DE AMOSTRA

O preparo de amostra dos alimentos infantis foi conduzido a partir de modificações do método proposto por McMullen et al. (2005) desenvolvido para análise de nitrato e nitrito em amostras de alimentos infantis por cromatografia iônica. A modificação do preparo de amostra citado compreendeu adaptar o procedimento ao sistema de CE e conferir maior frequência analítica, além de minimizar os custos de reagentes e geração de resíduos, uma vez que o método citado envolvia uso de elevados volumes de reagentes.

Na otimização do procedimento de preparo de amostras foi empregado planejamento fatorial  $2^3$  com triplicata no ponto central, uma visão geral do experimento fatorial é mostrada na Tabela 3 e a resposta do planejamento fatorial foi gerada a partir dos resultados com a Equação 1.

Tabela 5 – Planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central empregado na otimização do preparo de amostras de alimentos infantis para determinação simultânea de nitrato e nitrito utilizando CZE.

Variáveis	Fator	Nível		
		-1	0	+1
1	Massa, g	5	7,5	10
2	Tempo de agitação, min	1	5	10
3	Acetonitrila, mL	1	2	3

Fonte: próprio autor.

$$R = \frac{(\text{Área nitrato} + \text{Área nitrito})}{\text{tempo total da extração}} \quad \text{Equação 1}$$

A condição final de extração compreendeu o seguinte procedimento: uma alíquota de 10 mL de água desionizada (60°C) foi adicionada a um tubo de centrifugação contendo aproximadamente 10 g de amostra, a mistura resultante foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto, resfriada à temperatura ambiente e então transferida para um balão volumétrico. Adicionou-se 1 mL de acetonitrila (ACN) e o volume do balão foi ajustado para 25 mL, alíquotas foram transferidas para microtubos e procedeu-se à centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante da centrifugação foi então diluído na

proporção de 1:1 (v/v) com tiocianato (I.S.) até concentração final 25 mg L<sup>-1</sup> e injetado no equipamento de CE. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

## 4.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Os estudos de validação foram baseados nas normas da EURACHEM (1998) e em trabalhos publicados na literatura (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Os parâmetros de validação avaliados foram: conformidade do sistema, faixa de trabalho; linearidade; efeito de matriz; seletividade, precisão; robustez e limites de detecção e quantificação. Devido à semelhança na composição com base nos rótulos das formulações de alimentos infantis estudadas, os estudos de validação foram realizados em três das quatorze amostras, e os resultados considerados para as demais. As amostras escolhidas foram divididas em três categorias: alimento à base de vegetais (A); alimento à base de carne e vegetais (B) e alimento à base de frutas (C). O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi  $\alpha = 0,01$ .

### 4.5.1 Conformidade do sistema

O teste de conformidade do sistema foi realizado considerando o coeficiente de variação (CV) das médias obtidas de dez injeções consecutivas de solução padrão. Os parâmetros avaliados foram: área do pico corrigida ( $\text{Área}_{\text{analito}}/\text{Área}_{\text{I.S.}}$ ); tempo de migração corrigido ( $t_{m\text{analito}}/t_{m\text{I.S.}}$ ); resolução.

### 4.5.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir de curvas de calibração em solução padrão preparadas em triplicata, construídas em seis níveis de concentração distribuídos de forma equidistante (5-55 mg L<sup>-1</sup>) e analisadas de forma aleatória, como sugerido por Thompson, Ellison e Wood (2002).

Os parâmetros das curvas de calibração foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), o qual requer que as premissas de normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos sejam atendidas. A partir dos resultados obtidos fez-se

regressão linear e gráfico dos resíduos para verificar a presença de valores discrepantes (*outliers*), após a inspeção visual os possíveis *outliers* foram submetidos ao teste de Grubbs para confirmação (GRUBBS, 1969). Para verificar se as premissas referentes ao MMQO estavam sendo atendidas, os resíduos também foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), homoscedasticidade pelo teste de Cochran (COCHRAN, 1941), independência a partir do teste de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1951) e o ajuste ao modelo linear foi feito empregando o teste F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989).

### 4.5.3 Efeito de matriz

Devido à complexidade da matriz das amostras de alimentos infantis e a impossibilidade de encontrar uma amostra branca, as curvas de calibração da matriz foram construídas usando o método de adição de padrão (MERUSI et al., 2010).

Para verificação do ajuste ao modelo linear, os mesmo testes estatísticos aplicados à curva de solução padrão foram repetidos para a curva de matriz, em relação à presença de *outliers* e quanto às premissas de normalidade, homoscedasticidade, independência dos resíduos e ajuste ao modelo linear.

Para avaliação do efeito de matriz, fez-se a comparação das inclinações das curvas de solução padrão e curva de matriz, através da aplicação teste *t*. Para definir qual o tipo de teste *t* a ser empregado, realizou-se o teste *F*. De acordo com Bruce, Minkkinen e Riekkola (1998) se o *F* calculado for menor que o *F* tabelado, não há diferença significativa entre as variâncias, e neste caso, a matriz não afeta a precisão do método na faixa de trabalho avaliada. Neste caso, recomenda-se aplicar o teste *t* para variâncias equivalentes, e se o *t* calculado for menor que o *t* tabelado, confirma-se que não há efeito de matriz. Se o teste *F* apresentar diferença significativa (*F* calculado maior que *F* tabelado), deve-se aplicar o teste *t* para variâncias distintas, e nesse caso se *t* calculado for menor que *t* tabelado, não há efeito de matriz.

#### 4.5.4 Seletividade

A seletividade do método proposto foi verificada através do *software PeakMaster®*. A partir de simulações das condições de separação foi possível verificar se outros íons presentes nas amostras poderiam agir como possíveis interferentes na análise. O *software* foi adicionado dos parâmetros de análise como: composição do BGE (10 mmol L<sup>-1</sup> ácido perclórico e 40 mmol L<sup>-1</sup> β-alanina, pH 3,96); analitos (nitrato e nitrito) e I.S. (tiocianato); tensão de separação (30 kV); dimensões do capilar (32 cm, comprimento efetivo 8,5 cm); polaridade na injeção (negativa), ausência de EOF; modo de detecção direto; e por fim, a opção de correção da força iônica foi selecionada.

Dentre os íons que poderiam agir como possíveis interferentes ânions destacam-se: brometo; oxalato e sulfito. A seletividade foi estabelecida pela separação próxima a linha de base dos compostos no eletroferograma simulado.

#### 4.5.5 Precisão

A repetibilidade (precisão intra-ensaio) foi determinada a partir de três injeções consecutivas de soluções dos padrões de nitrato e nitrito em seis concentrações, a concentração do padrão interno foi mantida a 25 mg L<sup>-1</sup>. A reprodutibilidade (precisão inter-ensaio) foi verificada através da injeção de padrões de nitrato e nitrito em seis concentrações, injetadas em três diferentes ao longo de um mês.

#### 4.5.6 Exatidão

Para verificação da exatidão realizou-se testes de recuperação aparente de amostras fortificadas em três níveis de concentração, próximo ao primeiro ponto da faixa de trabalho, nível intermediário e próximo ao ponto mais alto da faixa de trabalho, em seis réplicas independentes injetadas de forma aleatória. Para os cálculos de recuperação das amostras sem efeito de matriz, utilizou-se a Equação 2.

$$Rec (\%) = \frac{\text{Camostra fortificada} - \text{Camostra não fortificada}}{\text{Cadicionada na fortificação}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$



Para a amostra que apresentou efeito de matriz, a recuperação foi calculada a partir da Equação 3.

$$Rec (\%) = \frac{\text{Camostra fortificada}}{\text{Cadicionada na fortificação}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Os cálculos de recuperação para amostras que apresentam efeito de matriz devem ser realizados de forma diferente, pois se considera na curva de calibração a concentração da amostra, quando  $y=0$ , por isso não se faz necessário subtrair novamente a concentração na amostra não fortificada.

#### 4.5.7 Limites de detecção e quantificação

O LOD do método foi estabelecido como a menor concentração detectada dos analitos em solução, equivalente a 3 vezes a relação sinal/ruído. O LOQ foi estabelecido através da relação 10 vezes a razão do sinal/ruído (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA; 1998; RIBEIRO et al., 2008).

#### 4.5.8 Robustez

O parâmetro robustez foi verificado através do método de *Youden* (YUDEN; STEINER, 1975), Esse método foi realizado empregando amostras fortificadas com solução padrão de nitrato e nitrito, pois todas as amostras de alimentos infantis apresentaram concentração de nitrito inferior ao LOQ. Sete parâmetros analíticos foram selecionados e pequenas variações foram induzidas nos valores nominais do método, oito corridas foram então executadas para determinar a influência de cada parâmetro no resultado final. Os parâmetros estudados foram: tensão aplicada; pH do BGE; temperatura de separação; pressão de injeção; comprimento de onda; tempo de lavagem entre corridas; e tempo de injeção.

Para cada combinação dos parâmetros de robustez, foram feitas três injeções de três amostras fortificadas (alimento à base de abóbora; alimento à base de frango e vegetais; alimento à base de macarrão e vegetais). Foram avaliados a partir dos resultados obtidos para cada combinação: concentração de nitrato e nitrito ( $\text{mg kg}^{-1}$ ); área corrigida

para nitrato e nitrito ( $\text{Área}_{\text{analito}}/\text{Área}_{\text{I.S.}}$ ); tempo de migração corrigido ( $t_{m \text{ analito}}/t_{m \text{ I.S.}}$ ); simetria da banda e resolução.

A Tabela 4 apresenta as condições nominais e alteradas do método para realização do teste de robustez.

Tabela 6 - Parâmetros analíticos e variações para avaliação do parâmetro robustez do método para determinação de nitrato e nitrito em amostras de alimentos infantis.

Parâmetro analítico	Condição nominal	Condição alterada
Tensão (kV)	30 (A)	29 (a)
pH	3,96 (B)	3,87 (b)
Temperatura (°C)	25 (C)	26 (c)
Pressão (mbar)	50 (D)	48 (d)
Comprimento de onda (nm)	210 (E)	212 (e)
Tempo de lavagem entre corridas (s)	30 (F)	20 (f)
Tempo de injeção (s)	3 (G)	4 (g)

Fonte: próprio autor.

O delineamento experimental dos parâmetros analíticos utilizados no teste de *Youden* é mostrado na Tabela 5. O número de total experimentos realizados foi 8, cada um com condições diferentes da condição nominal.

Tabela 7 - Delineamento experimental empregado no teste de *Youden*.

Parâmetros analíticos	Fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tensão (kV)	A	A	A	A	a	a	a	a
pH	B	B	b	b	B	B	b	b
Temperatura (°C)	C	c	C	c	C	c	C	c
Pressão (mbar)	D	D	d	d	d	d	D	D
Comprimento de onda (nm)	E	e	E	e	E	e	E	e
Tempo de lavagem entre corridas (s)	F	f	f	F	F	f	f	F
Tempo de injeção (s)	G	g	g	G	g	G	G	g
Tensão (kV)	s	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: próprio autor.

Para avaliar o efeito de cada parâmetro e estimar a robustez do método proposto, a média dos quatro valores nominais foi subtraída da média dos quatro valores correspondentes às condições alteradas. Um

exemplo do cálculo do efeito para o parâmetro tensão é mostrado na Equação 4.

$$A/a = (s + t + u + v/4) - (w + x + y + z/4) \text{ Equação 4}$$

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM ALIMENTOS INFANTIS

Quatorze amostras de alimentos infantis à base de vegetais foram adquiridas no comércio local da cidade de Florianópolis (SC) e analisadas quanto ao teor de nitrato e nitrito através dos métodos de separação e preparo e amostra propostos neste estudo.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística e tratamento dos dados foi conduzida empregando os *softwares* *Minitab 15*, *Statistica 7.0*, *Assistat 7.6*, *Origin 7.0* e *Microsoft Excel 2007*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OTIMIZAÇÃO DO ELETRÓLITO DE CORRIDA

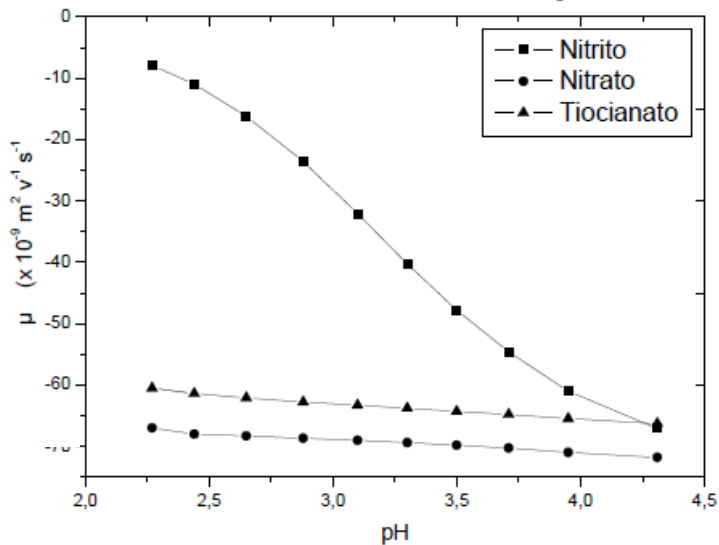
Os íons nitrato e nitrito apresentam absorção máxima em 210 nm, por isso as simulações foram realizadas usando o modo de detecção direta neste comprimento de onda. Para seleção adequada dos componentes do BGE foram consideradas várias características, incluindo boa capacidade tamponante e escolha de co-íon e contra-íon adequado para minimizar a assimetria das bandas e efeitos de dispersão.

De acordo com Merusi e colaboradores (2010) os íons nitrato e nitrito têm mobilidades eletroforéticas ( $\mu$ ) muito próximas, mas em condições de pH abaixo de 4 a mobilidade do nitrito pode ser reduzida (pka 3,2, dado *PeakMaster*<sup>®</sup>), pois nesta condição não estará completamente dissociado, desta forma o nitrito migra com menor mobilidade que o nitrato, facilitando a separação dos dois.

O co-íon escolhido foi o perclorato ( $\mu = -69,8 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) pois não absorve na região do UV e tem mobilidade similar a dos analitos ( $\mu = -74,10 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  e  $-74,60 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , nitrato e nitrito, respectivamente) o que minimiza a assimetria dos picos devido a dispersão por eletromigração (EMD). O I.S. escolhido foi o tiocianato, um ânion que absorve na região do UV, possui mobilidade próxima a dos analitos ( $\mu = -68,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) e não está presente nas amostras analisadas em concentrações detectáveis pelo método proposto.

O pH de separação foi definido a partir da curva de mobilidade efetiva *versus* pH (Figura 3) na qual se observa que a melhor condição de separação ocorre na faixa de pH de 3,7-4,0. A partir desta informação escolheu-se  $\beta$ -alanina como contra-íon, pois este composto tem pka 3,43 e então fornece capacidade tamponante, uma vez que o ácido perclórico usado não confere essa propriedade para o BGE.

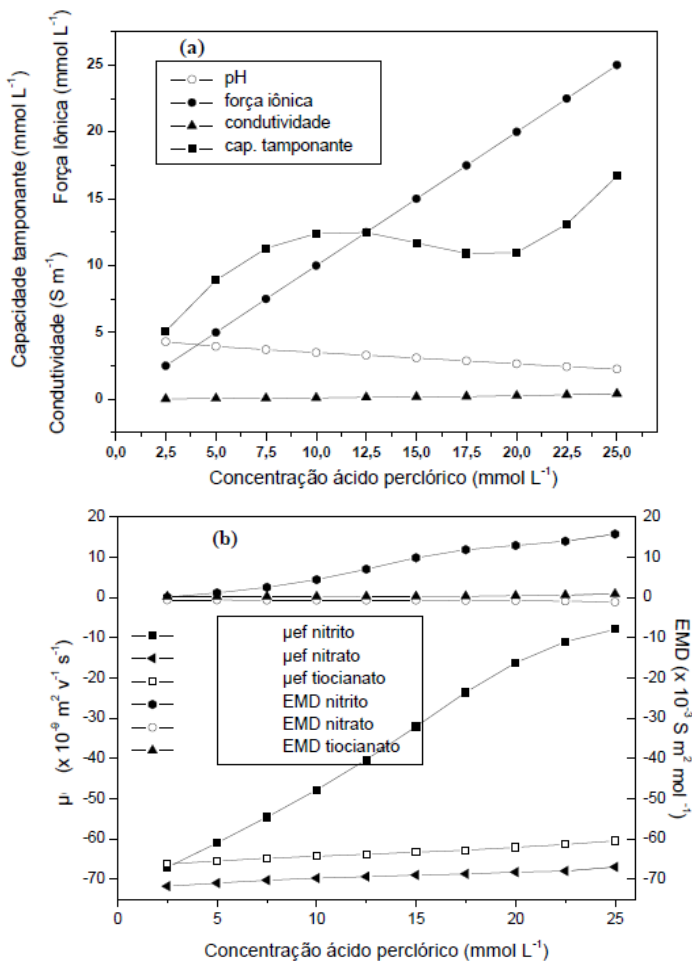
Figura 3 - Curva de mobilidade efetiva dos analitos versus pH.



Fonte: próprio autor.

As condições ideais de separação foram definidas através de simulações no *software PeakMaster®*, fixando a concentração de  $\beta$ -alanina e variando a concentração de ácido perclórico, como mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Otimização do BGE empregando o *software PeakMaster®* fixando a concentração de  $\beta$ -alanina ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e variando a concentração de ácido perclórico ( $2,5\text{-}25 \text{ mmol L}^{-1}$ ). (a) Parâmetros do eletrólito. (b) mobilidade efetiva e EMD *versus* concentração de ácido perclórico.

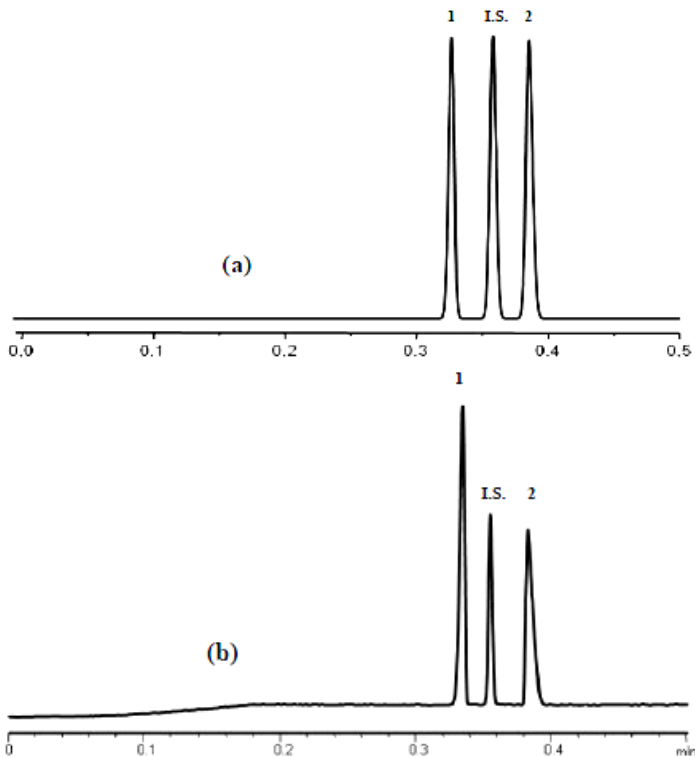


Fonte: próprio autor.

A composição escolhida para o BGE foi ácido perclórico 5 mmol L<sup>-1</sup> e β-alanina 20 mmol L<sup>-1</sup>, condição que forneceu baixa EMD para todos os analitos e pH adequado à separação. Além disso, com essa proporção dos componentes do BGE foi observada uma baixa condutividade e força iônica, o que minimiza a geração de calor no capilar permitindo uso de tensão elevada para obtenção de uma separação com tempo de análise reduzido. Com relação à capacidade tamponante foi obtido um valor menor que 10 mmol L<sup>-1</sup>, podendo não ser suficiente para manter o pH do BGE durante as separações, dessa forma, uma maneira adotada para melhorar essa propriedade do BGE foi o de aumentar em duas vezes os valores de concentração de ambos os componentes do BGE, resultando portanto em ácido perclórico 10 mmol L<sup>-1</sup> e β-alanina 40 mmol L<sup>-1</sup>. A condição final escolhida assegurou boas características do BGE para as separações de nitrato e nitrito por CE.

O *software PeakMaster*<sup>®</sup> demonstrou ser uma ferramenta bastante útil no desenvolvimento do método, reduzindo o número de experimentos e quantidade de reagentes requerida. O método proposto apresentou boa resolução e simetria das bandas eletroforéticas, além fornecer tempo de separação para nitrato, nitrito e tiocianato inferior a 30 s. Uma vez realizada a simulação pelo método desenvolvido foi realizada uma corrida experimental utilizando os valores selecionados para os parâmetros de separação a fim de avaliar se a condição experimental corresponderia à simulação. Na Figura 5 é apresentado o eletroferograma simulado e experimental. Um alto grau de similaridade foi observado entre os eletroferogramas simulado e experimental para soluções padrão, o que reafirma que as condições de separação foram escolhidas corretamente para o propósito.

Figura 5 - Eletroferograma da separação dos analitos. (a) simulação utilizando o *software PeakMaster*<sup>®</sup> e (b) em solução padrão. Legenda: 1 – nitrato; 2 – nitrito. Condições de separação: 10 mmol L<sup>-1</sup> de ácido perclórico e 40 mmol L<sup>-1</sup> de β-alanina, pH 3,96, injeção 50 mbar, 3 s, -30 kV, 32 cm (8,5 cm × 50 μm d.i. × 375 μm d.e.), detecção direta em 210 nm.



Fonte: próprio autor.



## 5.2 PLANEJAMENTO FATORIAL APLICADO À EXTRAÇÃO DE NITRATO E NITRITO

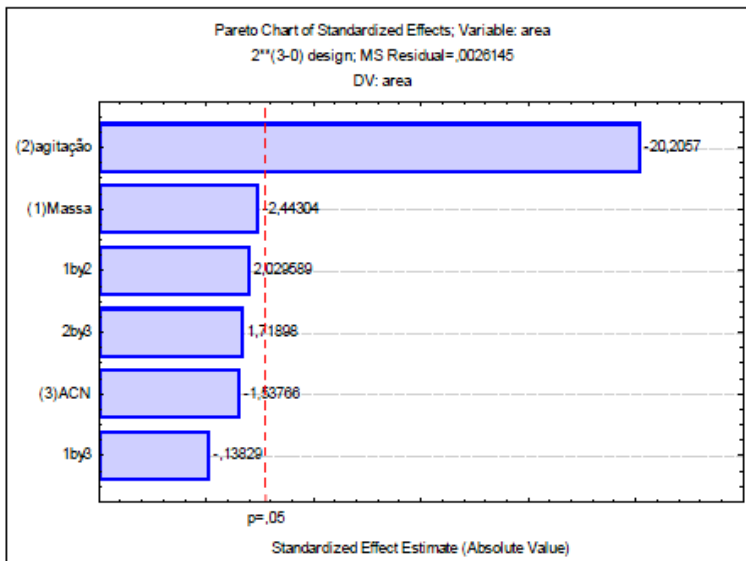
A otimização do método de extração de nitrato e nitrito de alimentos infantis foi baseada na solubilidade desses ânions em água, seguida da precipitação das proteínas com ACN, centrifugação, diluição e injeção no sistema de CE. A aplicação de um pequeno volume de ACN substituiu o uso de tetraborato de sódio e sulfato de zinco recomendados pelo método oficial da AOAC (AOAC, 2005). Apesar do conteúdo de gordura presente nas amostras, não foi necessário uma etapa adicional de remoção da mesma, uma vez que este componente da amostra não interferiu na análise.

Para obtenção de um procedimento de extração satisfatório com o menor tempo possível de preparo foi aplicado planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central em triplicata. Em estudos preliminares determinaram-se as variáveis que afetavam a extração de nitrato e nitrito, das quais foram definidas: massa de amostra (g), tempo de agitação (min) e volume de ACN (mL) para precipitação das proteínas (mL). Todas as variáveis foram avaliadas em dois níveis: nível inferior (-1) e superior (+1) e no ponto central (0) (Tabela 2, consultar seção materiais e métodos).

Outras variáveis, tais como a relação entre quantidade de amostra e volume de água usada na extração, diluição final e tempo de centrifugação foram mantidos constantes durante os experimentos. Os experimentos foram realizados de forma aleatória e a resposta obtida a partir da Equação 1 (consultar seção materiais e métodos), a qual considera o maior rendimento da extração dos analitos com o mínimo tempo de extração, a fim de obter maior frequência analítica.

A melhor condição de preparo obtida foi 10 g de massa de amostra, 1 mL de ACN e 1 minuto de agitação. Através do diagrama de Pareto observou-se que quando a agitação passou do nível baixo para alto houve um efeito negativo (Figura 6). Efeito esse que pode estar relacionado a uma possível emulsificação da gordura presente na amostra e aprisionamento dos analitos nas micelas formadas.

Figura 6 - Diagrama de Pareto resultante do planejamento fatorial utilizando na otimização do procedimento de preparo de amostra.



Fonte: próprio autor.

O uso de planejamento fatorial contribuiu representativamente para a otimização do método de preparo de amostra reduzindo o número de experimentos resultando em um preparo adequado. O método de extração otimizado mostrou ser efetivo para a determinação de nitrato e nitrito nas amostras analisadas. Outra característica positiva alcançada no método de preparo de amostra proposto foi o emprego de uma menor quantidade de reagentes quando comparado com o método oficial da AOAC (AOAC, 2005). Além disso, o preparo de amostra proposto mostrou ser rápido resultando em elevada frequência analítica, o que é importante para laboratórios de análise de rotina.

## 5.3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

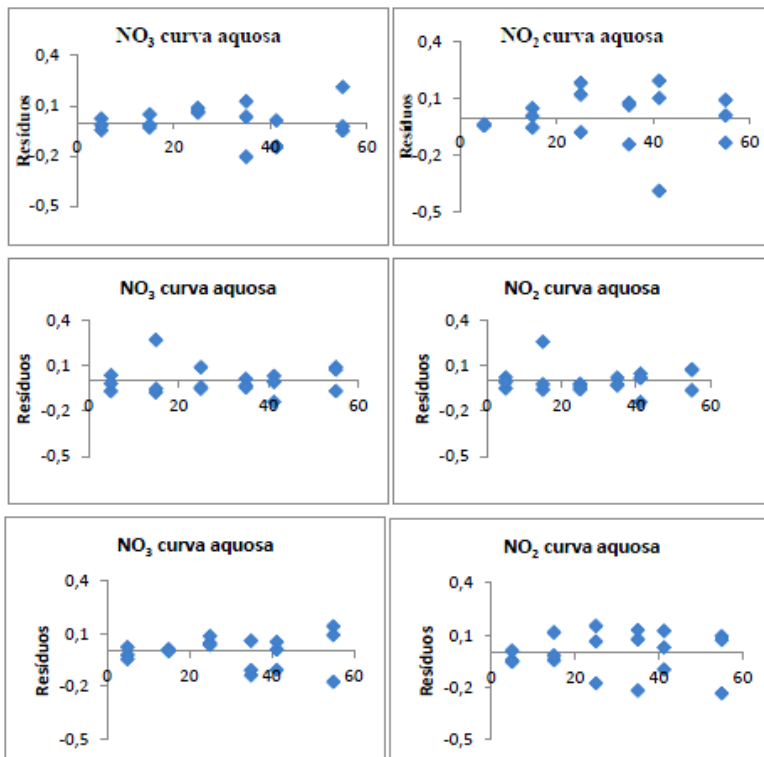
### 5.3.1 Conformidade do sistema

Os resultados de CV para a precisão instrumental foram 0,21 e 0,89% para o parâmetro tempo de migração corrigida, para nitrato e nitrito respectivamente. Enquanto que os valores para a área corrigida de nitrato foi 2,48 e para nitrito 3,42. Estes resultados demonstram que o sistema de análise é adequado para o uso em procedimentos de validação.

### 5.3.2 Linearidade

A partir dos resultados das análises, foram gerados os gráficos de regressão linear, os quais apresentaram  $R^2$  próximos a 0,99, para as curvas em solução padrão. Nos gráficos de resíduos foram identificados visualmente seis possíveis *outliers*, porém os mesmos não foram confirmados pelo teste de Grubbs, de forma que nenhum dado foi descartado. Os gráficos dos resíduos para as curvas em solução aquosa são apresentados na Figura 7.

Figura 7 - Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva aquosa.



Fonte: próprio autor.

Para verificar a distribuição normal dos dados foi realizado o teste de Shapiro-Wilk e os resultados do teste estão apresentados na Tabela 6. A distribuição normal dos dados foi confirmada pelo teste, sendo considerados normais devido  $W$  calculado ter sido maior que o  $W$  tabelado.

Tabela 8 - Resultados de normalidade teste de Shapiro-Wilk para curva aquosa.

Analito	W calculado	W Tabelado*	Resultado teste de hipótese
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (A)	0,942	0,858	Wcalc > Wtab, não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (A)	0,939	0,858	Wcalc > Wtab, não rejeita HO
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (B)	0,939	0,858	Wcalc > Wtab, não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (B)	0,937	0,858	Wcalc > Wtab, não rejeita HO
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (C)	0,945	0,858	Wcalc > Wtab, não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (C)	0,907	0,858	Wcalc > Wtab, não rejeita HO

Hipóteses: Ho = os dados provêm de uma distribuição normal; H1 = os dados não provêm de uma distribuição normal;

\*n=18

Fonte: próprio autor.

A homocedasticidade dos dados foi verificada pelo teste de Cochran e o resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7. A homoscedasticidade foi confirmada pelo teste, sendo homoscedásticos os dados quando o valor calculado for menor que o tabelado.

Tabela 9 - Resultados de homoscedasticidade teste de Cochran para curva aquosa.

Analito	C calculado	C tabelado*	Resultado teste de hipótese
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (A)	0,4769	0,7218	Ccalc < Ctab, não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (A)	0,6641	0,7218	Ccalc < Ctab, não rejeita HO
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (B)	0,5967	0,7218	Ccalc < Ctab, não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (B)	0,6154	0,7218	Ccalc < Ctab, não rejeita HO
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (C)	0,5634	0,7218	Ccalc < Ctab, não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (C)	0,2967	0,7218	Ccalc < Ctab, não rejeita HO

Hipóteses: Ho = os dados são homocedásticos; H1 = os dados não são homocedásticos;

\*n=18

Fonte: próprio autor.

Por fim foi realizado o teste de independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson (DW). Os valores de DW para nitrato e nitrito foram: 2,09 e 2,73 para a amostra A; 1,73 e 2,10 para a amostra B e 1,24 e 1,94 para a amostra C. Os resultados mostraram que a independência dos resíduos foi confirmada.

Segundo Souza e Junqueira (2005) quando os dados obtidos tem distribuição normal, são homoscedásticos e independentes, confirma-se

que a escolha do modelo MMQO é apropriada. A falta de ajuste ao modelo linear foi descartada através do teste  $F$ , quando  $F_{\text{calculado}}$  é maior que  $F_{\text{tabelado}}$  o modelo não apresenta falta de ajuste (Tabela 8). A partir da verificação das premissas, pode-se concluir que o modelo apresentado é linear na faixa de trabalho estudada (5 - 55 mg L<sup>-1</sup>).

Tabela 10 - Valores de  $F$  para verificação do ajuste ao modelo linear para curva aquosa.

Analito	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}}$
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (A)	2828,38	1,16
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (A)	1356,41	1,16
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (B)	4698,66	1,16
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (B)	4977,21	1,16
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (C)	3950,97	1,16
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (C)	1873,26	1,16

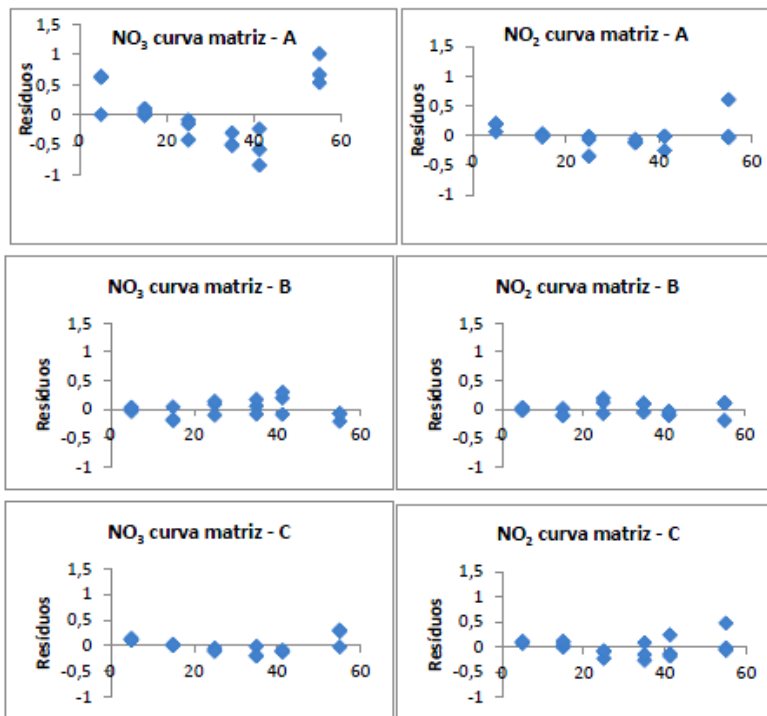
n=18

Fonte: próprio autor.

### 5.3.3 Efeito de matriz

Os dados da curva em matriz foram tratados de forma similar aos dados dos analitos em solução padrão. Os gráficos dos resíduos para as três amostras são apresentados na Figura 8. Nos gráficos dos resíduos foram identificados visualmente cinco possíveis *outliers*, os quais não foram confirmados pelo teste de Grubbs. Onde: (A) alimento à base de vegetais; (B) alimento à base de carne e vegetais; (C) alimento à base de frutas.

Figura 8 - Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva de matriz.



Fonte: próprio autor.

Os testes de normalidade dos dados para a curva de matriz foram avaliados pelo teste Shapiro-Wilk e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9. Os dados podem ser considerados normais quando  $W$  calculado for maior que o  $W$  tabelado. Assim, os resultados do teste mostraram que os dados seguem uma distribuição normal.

Tabela 11 - Resultados de normalidade teste de Shapiro-Wilk para curva de matriz.

Analito (Amostra)	W calculado	W tabelado*	Resultado teste de hipótese
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (A)	0,871	0,858	W <sub>calc</sub> > W <sub>tab</sub> , não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (A)	0,946	0,858	W <sub>calc</sub> > W <sub>tab</sub> , não rejeita HO
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (B)	0,926	0,858	W <sub>calc</sub> > W <sub>tab</sub> , não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (B)	0,934	0,858	W <sub>calc</sub> > W <sub>tab</sub> , não rejeita HO
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (C)	0,909	0,858	W <sub>calc</sub> > W <sub>tab</sub> , não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (C)	0,942	0,858	W <sub>calc</sub> > W <sub>tab</sub> , não rejeita HO

Hipóteses: H<sub>0</sub> = os dados provêm de uma distribuição normal; H<sub>1</sub> = os dados não provêm de uma distribuição normal;

\*n=18

Fonte: próprio autor.

O teste de homocedasticidade dos dados foi realizada pelo teste de Cochran e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10. A análise dos resultados revelou que os dados da curva matriz são homocedásticos..

Tabela 12 - Resultados de homoscedasticidade teste de Cochran curva de matriz.

Analito (amostra)	Ccalculado	Ctabelado*	Resultado teste de hipótese
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (A)	0,3933	0,7218	C <sub>calc</sub> < C <sub>tab</sub> , não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (A)	0,6641	0,7218	C <sub>calc</sub> < C <sub>tab</sub> , não rejeita HO
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (B)	0,4100	0,7218	C <sub>calc</sub> < C <sub>tab</sub> , não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (B)	0,4655	0,7218	C <sub>calc</sub> < C <sub>tab</sub> , não rejeita HO
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (C)	0,8511	0,7218	C <sub>calc</sub> < C <sub>tab</sub> , não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (C)	0,4767	0,7218	C <sub>calc</sub> < C <sub>tab</sub> , não rejeita HO

Hipóteses: H<sub>0</sub> = os dados são homocedásticos; H<sub>1</sub> os dados não são homocedásticos;

\*n=18

Fonte: próprio autor.



Por fim, foi realizado o teste de independência usando DW, no qual a amostra A apresentou os valores de DW= 0,92 para nitrato e 1,71 para nitrito, a amostra B apresentou DW= 2,43 para nitrato, 2,73 para nitrito, e a amostra C obteve-se os valores de DW= 1,85 para o nitrato e 1,18 para nitrito. O teste de independência mostrou que os resíduos da curva matriz são independentes.

Os dados obtidos apresentaram normalidade, homoscedasticidade, independência, e através do teste *F* não foi verificado falta de ajuste (Tabela 11), o que permite concluir que o modelo apresentado é linear na faixa de trabalho estudada (5-55 mg L<sup>-1</sup>).

Tabela 13 - Valores de F para verificação do ajuste ao modelo linear das curvas de matriz.

Analito (Amostra)	F calculado*	F tabelado
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (A)	109,28	1,16
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (A)	758,92	1,16
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (B)	192,97	1,16
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (B)	2926,74	1,16
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (C)	1954,83	1,16
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (C)	733,18	1,16

n=18

Fonte: próprio autor.

Para avaliação do efeito de matriz comparou-se a inclinação das curvas preparadas em solução padrão e de matriz. Através do teste *F*, é verificada a homogeneidade das variâncias. Quando *F* calculado for maior que *F* tabelado, as variâncias são homogêneas, e então, aplica-se o teste *t-Student* para amostras com variâncias equivalentes. Caso contrário, pode se usar o teste *t* para as variâncias distintas (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998). O resultado do teste *t* é mostrado na Tabela 12.

Tabela 14 - Verificação do efeito de matriz através do teste *t-Student*.

Analito (Amostra)	t calculado	t tabelado*	Resultado teste de hipótese
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (A)	2,07E-15	4,604	tcalculado < ttabelado, não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (A)	1,213655	4,604	tcalculado < ttabelado, não rejeita HO
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (B)	3,292197	4,604	tcalculado < ttabelado, não rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (B)	1,455989	4,604	tcalculado < ttabelado, não rejeita HO
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (C)	9,676777	4,604	tcalculado > ttabelado, rejeita HO
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (C)	1,160392	4,604	tcalculado < ttabelado, não rejeita HO

Hipóteses: Ho = não há efeito de matriz; H1 = há efeito de matriz;

n=18

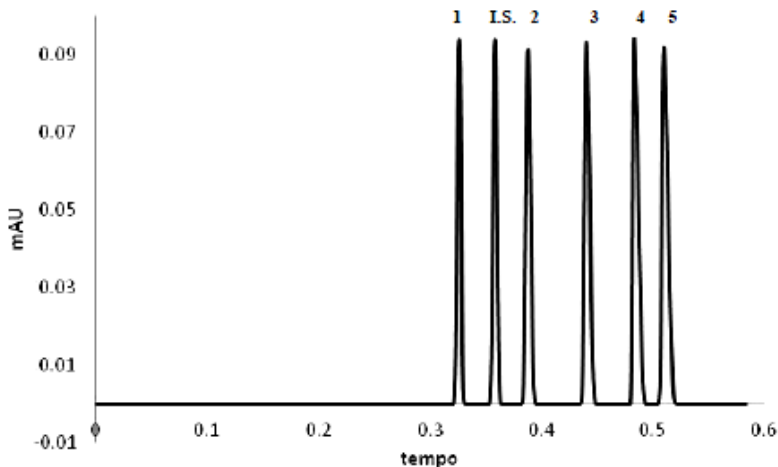
Fonte: próprio autor.

A partir do teste *t* verificou-se que as amostras A e B não possuem efeito de matriz, enquanto que para a amostra C foi demonstrado a interferência da matriz no ensaio, para a determinação do nitrato. Dessa forma, a quantificação deste analito nas amostras com matrizes semelhantes a amostra C será realizada nas curvas de adição de padrão. As demais quantificações de nitrato e nitrito serão feitas utilizando calibração externa com o uso de soluções padrões em água desionizada.

### 5.3.4 Seletividade

Nas amostras de alimentos infantis estão presentes muitas espécies ionizáveis que poderiam interferir na determinação de nitrato e nitrito por CE. Os ânions potencialmente interferentes avaliados foram o brometo, oxalato e sulfito. A partir de simulações no *software PeakMaster*<sup>®</sup> pode-se confirmar que na condição simulada nenhum deles interfere na determinação dos analitos de interesse, permitindo a separação de todos os analitos simulados, como mostrado na Figura 9.

Figura 9 - Seletividade simulada no *software PeakMaster®*. Legenda: (1) nitrato; I.S.; (2) nitrito; (3) brometo; (4) oxalato; (5) sulfito. Condições de separação simuladas: 10 mmol L<sup>-1</sup> de ácido perclórico e 40 mmol L<sup>-1</sup> de β-alanina, pH 3,96, injeção 50 mbar, 3 s, -30 kV, 32 cm (8,5 cm × 50 μm d.i. × 375 μm d.e.), detecção direta em 210 nm.



Fonte: próprio autor.

### 5.3.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada usando soluções padrão de nitrato e nitrito em diferentes níveis de concentração e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13. Os coeficientes de variação (CV) da precisão intra-ensaio variaram de 0,02 a 7,16% e nos inter-ensaio variaram entre 1,29 a 10,53%. Os resultados podem ser considerados adequados, uma vez que para a faixa de concentração de nitrato e nitrito nas amostras de alimentos infantis a AOAC considera aceitáveis valores de CV até 11% (AOAC, 2012).

Tabela 15 - Precisão intra e inter-ensaio para nitrato e nitrito em amostras de alimentos infantis.

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Analito	Intra-ensaio* (CV%)		Inter-ensaio** (CV%)	
		Tempo de migração	Area do pico	Tempo de migração	Area do pico
5	NO <sub>3</sub>	0,17	7,16	1,44	7,82
5	NO <sub>2</sub>	0,02	7,49	1,85	9,21
15	NO <sub>3</sub>	1,32	0,44	3,36	10,53
15	NO <sub>2</sub>	0,89	6,77	3,81	10,34
25	NO <sub>3</sub>	0,45	1,25	1,49	6,46
25	NO <sub>2</sub>	0,62	8,44	1,29	6,49
35	NO <sub>3</sub>	0,15	3,82	1,40	9,02
35	NO <sub>2</sub>	0,14	6,78	1,29	6,81
45	NO <sub>3</sub>	0,21	2,48	1,36	6,95
45	NO <sub>2</sub>	0,95	3,42	1,38	5,45
55	NO <sub>3</sub>	0,03	3,85	1,28	10,17
55	NO <sub>2</sub>	0,04	4,30	1,31	10,08

\* n=6; \*\* n=18.

Fonte: próprio autor.

### 5.3.6 Exatidão

A recuperação de nitrato e nitrito foi avaliada usando três níveis de concentração adicionados a três amostras de matrizes diferentes. As médias dos resultados obtidos pelos ensaios de recuperação estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 16 - Médias de recuperação aparente para nitrato e nitrito em amostras de alimentos infantis, em diferentes níveis de concentração.

	Amostra	Recuperação NO <sub>3</sub> (%)	Recuperação NO <sub>2</sub> (%)
Nível inferior	A	77,3 ± 6,7	93,9 ± 2,7
	B	78,8 ± 5,6	85,6 ± 6,6
	C	104 ± 13,7	71,0 ± 10,4
Nível intermediário	A	81,7 ± 8,7	100,5 ± 4,3
	B	87,12 ± 10,2	87,1 ± 10,2
	C	108,8 ± 9,5	81,6 ± 6,5
Nível superior	A	93,1 ± 9,3	103,6 ± 4,1
	B	89,2 ± 5,4	89,2 ± 5,4
	C	99,6 ± 11,3	72,8 ± 4,8

Fonte: próprio autor.

Os valores de recuperação para o nitrato variaram de 77,3 a 93,1 % para a amostra A, de 78,8 a 89,2 % para a amostra B e de 99,6 a 108,8 % para a amostra C. Para o nitrito os valores de recuperação variaram de 93,9 a 103,6 % para a amostra A, 85,6 a 89,18 % para amostra B e 71,0 a 81,6% para a amostra C. A amostra que apresentou resultados de recuperação inferiores foi a amostra que apresentou efeito de matriz, o que pode ser explicado por sua maior complexidade, o qual implica em uma alteração no sinal do analito.

A AOAC considera aceitável valores de recuperação entre 70-120% para analitos presentes nas amostras em níveis de ppm e ppb. Sendo assim todas as amostras apresentaram resultados de recuperação adequados (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998).

### 5.3.7 Limites de detecção e quantificação

Os valores de LOD e LOQ para o nitrato e nitrito foram determinados pela razão sinal/ruído observados no eletroferograma. Através do procedimento experimental ficou estabelecido que o LOD do método é 0,09 mg L<sup>-1</sup> para o nitrato e 0,15 mg L<sup>-1</sup> para o nitrito, enquanto que o LOQ foi 0,30 mg L<sup>-1</sup> para o nitrato e 0,49 mg L<sup>-1</sup> para nitrito.

### **5.3.8 Robustez**

Os resultados da avaliação da robustez avaliada através do teste de *Youden* para o nitrato são apresentados na Tabela 15 e para o nitrito na Tabela 16.

Tabela 17 - Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o nitrato.

Nitrato	Área	Tempo de migração (s)	Concentração (m mol L <sup>-1</sup> )	Simetria	Resolução
Tensão	1,99 - 2,090 = -0,0100	1,119 - 0,945 = 0,173	23,059 - 24,217 = -1,158	0,958 - 1,414 = -0,456	0,987 - 1,304 = -0,317
pH	2,056 - 2,027 = 0,029	0,947 - 0,945 = -0,001	23,806 - 23,469 = 0,337	1,096 - 1,179 = -0,083	1,059 - 1,232 = -0,172
Temperatura	2,113 - 1,971 = 0,142	0,945 - 0,947 = -0,001	24,458 - 22,818 = 1,640	0,854 - 1,125 = -0,270	1,303 - 0,988 = 0,315
Pressão	2,103 - 1,981 = 0,122	0,944 - 0,948 = -0,0031	24,342 - 22,934 = 1,4079	1,321 - 0,954 = 0,367	1,523 - 0,769 = 0,754
Comp. De onda	2,113 - 1,971 = 0,142	0,945 - 0,802 = 0,142	24,458 - 22,818 = 1,640	0,854 - 1,420 = -0,565	1,303 - 0,988 = 0,315
Tempo de lavagem	2,056 - 2,027 = -0,041	0,947 - 0,945 = 0,0013	23,801 - 23,474 = 0,327	1,413 - 0,861 = 0,551	1,170 - 1,101 = 0,0688
Tempo de injeção	2,008 - 2,075 = -0,066	0,946 - 0,946 = 0,0008	23,255 - 24,020 = -0,764	0,861 - 0,855 = -0,551	1,161 - 1,130 = 0,030

Fonte: próprio autor.

Tabela 18 - Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o nitrito.

Nitrito	Área	Tempo de migração (s)	Concentração (m mol L <sup>-1</sup> )	Simetria	Resolução
Tensão	1,846 - 1,888 = -0,041	1,119 - 1,129 = -0,006	23,275 - 23,275 = -0,523	0,857 - 0,704 = 0,1535	1,750 - 2,281 = -0,531
pH	1,895 - 1,839 = 0,055	1,082 - 1,163 = -0,080	23,890 - 23,184 = 0,705	0,847 - 0,675 = 0,172	1,321 - 2,710 = -1,388
Temperatura	1,887 - 1,847 = 0,039	1,123 - 1,122 = 0,0006	23,788 - 23,286 = 0,501	0,833 - 0,728 = 0,104	2,124 - 1,908 = 0,216
Pressão	2,027 - 1,826 = 0,200	1,118 - 1,126 = -0,007	24,054 - 23,019 = 1,035	0,754 - 0,807 = -0,053	2,397 - 1,634 = 0,763
Comp. De onda	1,887 - 1,847 = 0,039	1,123 - 1,122 = 0,0006	23,788 - 23,286 = 0,501	0,833 - 0,728 = 0,104	2,124 - 1,908 = 0,216
Tempo de lavagem	1,858 - 1,877 = -0,018	1,117 - 1,128 = -0,011	23,419 - 23,654 = -0,234	0,847 - 0,826 = 0,021	2,174 - 1,991 = 0,182
Tempo de injeção	1,854 - 1,881 = -0,026	1,124 - 1,121 = 0,003	23,369 - 23,705 = -0,335	0,855 - 0,706 = 0,149	2,211 - 1,821 = 0,390

Fonte: próprio autor.

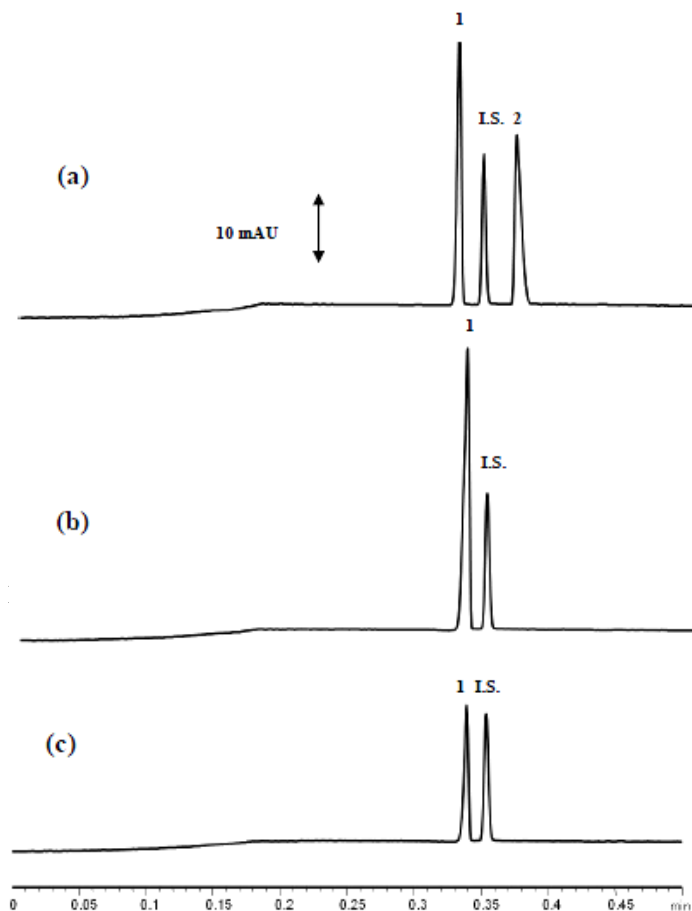


Usando o critério do teste de *Youden*, o método de CE mostrou-se altamente robusto para nitrato e nitrito. A maior variação no conteúdo de nitrato foi 1,64% quando a temperatura e o comprimento de onda foram alterados. Para a concentração de nitrito a maior variação foi 1,03% quando a pressão foi alterada, valores considerados pouco significativos.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM ALIMENTOS INFANTIS

Após ser validado o método proposto foi aplicado na determinação de nitrato e nitrito em quatorze amostras comerciais de alimentos infantis. Todas as determinações foram conduzidas em triplicata de preparo, os eletroferogramas são mostrados na Figura 10 e os resultados das análises são apresentados na Tabela 17.

Figura 10 - Eletroferograma da separação dos analitos em (a) solução padrão (b) alimento orgânico à base de abóbora; (c) Alimento à base de frango e vegetais. Onde: (1) nitrato; (I.S.) tiocianato; (2) nitrito. Condições de separação: 10 mmol L<sup>-1</sup> de ácido perclórico e 40 mmol L<sup>-1</sup> de β-alanina, pH 3,96, injeção 50 mbar, 3 s, -30 kV, 32 cm (8,5 cm × 50 μm d.i. × 375 μm d.e.), detecção direta em 210 nm.



Fonte: próprio autor.

Tabela 19 - Determinação de nitrato e nitrito em alimentos infantis.

Amostra	Nitrato (mg kg <sup>-1</sup> )	Nitrito (mg kg <sup>-1</sup> )
Alimento à base de vegetais (A)	135,58 ± 2,58	< LOD
Alimento à base de carne e legumes (B)	97,12 ± 7,41	< LOD
Alimento à base de banana e leite (C)	8,44 ± 4,41	< LOD
Alimento orgânico à base de macarrão e vegetais (D)	222,68 ± 4,72	< LOD
Alimento orgânico à base de abóbora (E)	247,70 ± 6,52	< LOD
Alimento à base de carne e vegetais (F)	63,87 ± 1,39	< LOD
Alimento à base de hortaliças e frango (G)	157,58 ± 4,37	< LOD
Alimento à base de beterraba (H)	205,07 ± 6,24	< LOD
Alimento à base de frango e vegetais (I)	61,34 ± 1,82	< LOD
Alimento à base de carne, legumes e macarrão (J)	45,23 ± 3,94	< LOD
Alimento à base de legumes e carne (L)	45,81 ± 0,52	< LOD
Alimento à base de gema de ovo, carne e vegetais (M)	65,35 ± 0,81	< LOD
Alimento à base de peru, vegetais e arroz (N)	74,49 ± 2,66	< LOD
Alimento à base de frango, vegetais e macarrão (O)	33,86 ± 1,24	< LOD

Fonte: próprio autor.

Os eletroferogramas das amostras apresentaram comportamento semelhante aos eletroferogramas em solução padrão, limpos e livres de interferentes. Devido à ausência de nitrito nas amostras observa-se apenas nitrato e I.S.

A amostra à base de banana e leite (C) apresentou a menor concentração de nitrato entre as amostras analisadas (8,84 mg kg<sup>-1</sup>). Esse resultado era esperado uma vez que as frutas possuem menores níveis de nitrato se comparadas com os vegetais, pois o nitrato é exclusivamente transportado pelo xilema. Além de que quando a necessidade metabólica da planta é excedida esta tende a acumular nitrato principalmente em suas partes aéreas e raízes (BLOM-ZANDSTRA, 1989).

As maiores concentrações de nitrato foram encontradas nas amostras orgânicas (D e E), o que discorda com estudos que apontam que o conteúdo de nitrato nos alimentos orgânicos é menor quando comparado com alimentos convencionais (WINTER; DAVIS, 2006). Para Pardo-Marín e colaboradores (2010) a concentração de nitrato nos vegetais depende de fatores ambientais como luminosidade, tipo de solo, temperatura, umidade, período de colheita, tempo de armazenagem e fonte de nitrogênio. Os altos níveis de nitrato apresentados pelas amostras de alimentos infantis orgânicos podem estar relacionados aos

ingredientes da formulação (ambas as amostras apresentavam na composição vegetais ricos em nitrato). Isso configura uma falha no controle de qualidade uma vez que ambas as amostras eram da mesma marca ou ainda pelo fato destas amostras terem sido produzidas no inverno e a menor incidência solar pode ter contribuído para um aumento nos níveis de nitrato. Outras amostras formuladas com ingredientes ricos em nitrato como beterraba, espinafre e cenoura também apresentaram elevados valores de nitrato, mas estavam abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira.

Com exceção da amostra E ( $247,70 \pm 6,52$ ), todas as amostras analisadas apresentaram conteúdo de nitrato inferior ao limite estabelecido pela ANVISA ( $250 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e em todas as amostras nitrito esteve abaixo do limite de detecção. Os limites estabelecidos pela legislação brasileira são maiores do que os da União Europeia (EU), a qual estabelece  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  como máximo (EUROPEAN COMMISSION, 2006). Caso a legislação europeia fosse seguida no Brasil, três amostras seriam consideradas inadequadas para consumo.

Os estudos envolvendo a determinação de nitrato e nitrito nesse tipo de matriz são bastante limitados, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos com dados da literatura. McMullen e colaboradores (2005) determinaram nitrato e nitrito em seis amostras de alimentos infantis por cromatografia iônica. Nitrito não foi detectado em nenhuma das amostras e os níveis de nitrato encontrados variaram de 96 a  $1084 \text{ mg kg}^{-1}$ . Sendo que duas amostras excederam os limites estabelecidos pela legislação e os resultados obtidos pelos autores foram mais elevados do que os encontrados neste estudo.

Quando comparado o tempo de análise entre o método de CZE aqui desenvolvido (separação em tempo  $< 30\text{s}$ ) e o aplicado pelos autores (separação em 20 min), comprova-se a capacidade da CE em desenvolver métodos rápidos e eficiência de separação, quando os parâmetros experimentais são escolhidos de forma adequada.

Com o objetivo de avaliar os níveis de nitrato em vegetais e em alimentos infantis a base de vegetais em Valência na Espanha, 1150 amostras (1083 de vegetais e 67 alimentos infantis) foram analisadas por HPLC no período de 2000-2008 (PARDO-MARÍN et al., 2010). Os níveis médios de nitrato nas amostras de alimentos infantis foi  $60,4 \pm 38,6 \text{ mg kg}^{-1}$  e todas as amostras estavam de acordo com os limites estabelecidos pela legislação da EU.

Devido à elevada concentração de nitrato presente em algumas amostras recomenda-se que sejam seguidas as indicações do fabricante quanto à forma de consumo, acondicionamento e faixa etária indicada para cada tipo de formulação. O fabricante recomenda que após aberto, o produto deve ser consumido em até 24 horas, caso contrário pode-se gerar condições favoráveis à conversão de nitrato em nitrito por bactérias nitrato-redutoras e expor o consumidor ao risco de intoxicação por nitrito.

## 6 CONCLUSÕES

Através deste trabalho podemos concluir que a utilização do *software* de simulação em eletroforese capilar *PeakMaster*<sup>®</sup>, permitiu desenvolver um método de separação cujos resultados experimentais são muito próximos aos simulados.

O planejamento fatorial mostrou ser uma ferramenta útil para otimização do procedimento de preparo de amostra, com reduzido número de experimentos permitiu a obtenção de um preparo adequado, mais simples, rápido e com menor custo quando comparado com o método oficial da AOAC.

O método de CZE foi validado e demonstrou bons resultados para os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação, comprovando a eficiência do método e demonstrando a aplicabilidade da CE para a determinação de nitrato e nitrito em alimentos infantis.

Este estudo também demonstrou a importância do constante monitoramento desses compostos para a garantia da segurança da qualidade de alimentos infantis, uma vez que dentre as quatorze amostras avaliadas uma apresentava teor de nitrato superior aos limites estabelecidos pela legislação brasileira (250 mg kg<sup>-1</sup>).

É importante ressaltar que o método desenvolvido foi capaz de separar os analitos em um tempo menor que de 0,5 minutos, e, associado ao preparo da amostra otimizado, apresentou potencial para ser empregado como método alternativo ou complementar para análises de nitrato e nitrito em amostras de alimentos infantis em laboratórios de rotina e fiscalização.

## 7 REFERÊNCIAS

AHMED, M. J. et al. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow-injection analysis. **Talanta**, Ioannina, v. 43, p. 1009-1018, 1996.

AL-ASSAF, A. H et al. Mechanism of cadmium induced apoptosis in human peripheral blood lymphocytes: The role of p53, Fas and Caspase-3. **Environmental toxicology and pharmacology**, Riyadh, v. 36, p. 1033–1039, 2013.

ANDRADE, R. et al. A flow-injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide generation. **Food Chemistry**, Campinas, v. 80, n. 4, pp. 597-602, 2003.

AOAC, Method 933.03, **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, 2005.

AOAC. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. In: **AOAC official methods of analysis**, 2012.

EVERY, A. A. Infantile Methemoglobinemia: Reexamining the Role of Drinking Water Nitrates. **Environmental Health Perspectives**, Churchville, v. 107, n. 7, 1999.

BLOM-ZANDSTRA, M. Nitrate accumulation in vegetables and its relationship to quality. **Annals of Applied Biology**, Wageningen, v. 115, n. 3, p. 553–561, 1989.

BRASIL (1998). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n<sup>o</sup> 34, de 13 de janeiro de 1998. **Regulamento técnico referente a alimentos de transição para lactentes e crianças de primeira infância**. Brasília, 1998.

BRIÔNE, W. et al. Comparison of liquid chromatography and capillary electrophoresis methods for quantification of sodium residuals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Mont-Saint-Guibert, v. 44, p. 615–622, 2007.

BRISCOE, C. J.; STILES, M. R.; HAGE, D. S. System suitability in bioanalytical LC/MS/MS., **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Lincoln, v. 44, p. 484–91, 2007.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimica acta**, Kantsvik, v. 128, p. 93-106, 1998.

BUSSAB, W. D. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica**. 6. Ed. São Paulo: Saraiva, 2010. 540 p.

CAMMACK, R. et al. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. **Biochimica et Biophysica Acta**, London, v. 1411, p. 475-488, 1999.

CHAN, T. Y. K. Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinaemia. **Toxicology Letters**, Shatin, v. 200, p. 107–108, 2011.

COCHRAN, W. G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. **Annals of Eugenics**, [S. l.], v. 11, p.47-52, 1941.

COLOMBARA R.; TAVARES M. F. M.; MASSARO S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n.5, p. 512-518, 1997.

COSTA, A. C. O. **Metodologias para determinação de fármacos, seus metabólitos e desreguladores endócrinos em águas brutas voltadas ao abastecimento público utilizando técnicas de separação em meio líquido (CE/UV, CE-MS, LC-MS/MS)**. 2009. 294 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

DELLA BETTA, F.; VITALI, L.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Development and validation of a sub-minute capillary zone



electrophoresis method for determination of nitrate and nitrite in baby food. **Talanta**, Florianópolis, v. 122, p. 23-29, 2014.

DURBIN, J. WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. **Biometrika**, [S. l.], v. 38, p. 159–178, 1951.

EURACHEM. (1998). *The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics*. (1<sup>st</sup> ed.). Teddington, UK.

EUROPEAN COMMISSION. 2006. **Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs**. Official Journal of European Community. L364:5–24.

FERGUSON, L. R. Meat and Cancer. **Meat Science**, Auckland, v. 84, p. 308–313, 2010.

FUKUSHI, K. et al. Determination of free calcium in vegetables by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Kobe, v. 759, p. 211-216, 1997.

GREER, F. R.; SHANNON, M. Infant Methemoglobinemia: The Role of Dietary Nitrate in Food and Water. **Pediatrics**, [S. l.], v. 116, n. 3, 784-786, 2005.

GRUBBS, F. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples, **Technometrics**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1-21, 1969.

HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. 5.ed. Rio de Janeiro (RJ): LTC, 2008. xix,862p

HEIGER, D.; WEINBERGER, R. **Determination of small ions by capillary zone electrophoresis with indirect photometric detection**. Application Note. Disponível em:  
<<http://cp.chem.agilent.com/Library/applications/59631138.pdf>>  
Acesso em 20 Maio 2012.

HORD, N. G.; TANG, Y.; BRYAN, N. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. **American journal of clinical nutrition**, East Lansing, v. 90, p. 1–10, 2009.

HUND, E. et al. Derivation of system suitability test limits from a robustness test on an LC assay with complex antibiotic samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Brussels, v. 30, n. 4., p. 1197–1206, 2002.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos - DOQ-CGCRE-008**. 2007. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf)> Acesso em 02 Julho.

JASTRZEBSKA, A. Application of capillary isotachophoretic method to the determination of nitrate and nitrite ions in meat products. **Journal of Analytical Chemistry**, Torun, v. 65, n. 11, p. 1170–1175, 2010.

JOHNS, C. et al. Simultaneous separation of anion and cations by capillary electrophoresis with high magnitude, reversed electroosmotic flow. **Journal of Chromatography A**, Tasmania, v. 1050, p. 217-222, 2004.

LANDERS, J.P. **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**, third ed. CRC Press: New York, 2008.

MAGEE, P. N. Nitrogen as a potential hazard. **Philosophical Transactions of The Royal Society of London**, Dublin, v. 296, p.543-550, 1982.

MARTINEZ, A. et al. Methemoglobinemia induced by vegetable intake in infants in northern Spain. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Pamplona, v. 56, n. 5, 2013.

MCMULLEN, S. E. et al. Ion Chromatographic Determination of Nitrate and Nitrite in Vegetable and Fruit Baby Foods. **Journal of AOAC international**, Atlanta, v. 88, n. 6, p. 1793-1796, 2005.

MERUSI, C. et al. Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal. **Food Chemistry**, Parma, v. 129, p. 615–620, 2010.

MOTELLIER, S.; PETIT, S.; DECAMBOX, P. Quantitative capillary electrophoretic **analysis for calcium and magnesium in sodium–matrix waters**. **Analytica Chimica Acta**, Gif-sur-Yvette Cedex, v. 410, p. 11–23, 2000.

OLIVEIRA, M. A. L. et al. Optimization of an alternative methodology for simultaneous analysis of nitrite and nitrate in water from urban stream by capillary electrophoresis under direct UV detection. **American Journal of Analytical Chemistry**, Juiz de Fora, v. 3, p. 484–490, 2012.

ÖZTEKIN, N.; NUTKU, M. S.; ERIM, F. B. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, Istanbul, v. 76, p. 103–106, 2002.

PANDELOVA, M. et al. Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, and Zn contents in baby foods from the EU market: Comparison of assessed infant intakes with the present safety limits for minerals and trace elements. **Journal of Food Composition and Analysis**, Neuherberg, v. 27, n. 2, p. 120–127, 2012.

PARDO-MARÍN, O. et al. Monitoring programme on nitrates in vegetables and vegetable-based baby foods marketed in the Region of Valencia, Spain: levels and estimated daily intake. **Food Additives and Contaminants**, València, v. 27, n. 4, p. 478–486, 2010.

PEREIRA, E. A.; PETRUCI, J. F. S.; CARDOSO, A. A. Determination of nitrite and nitrate in Brazilian meats using high shear homogenization. **Food Analytical Methods**, Lavras, v. 5, p. 637–642, 2012.

PÉREZ-OLMOS, R. et al. Sequential potentiometric determination of chloride and nitrate in meat products. **Food Chemistry**, Bilbal, v. 59, n. 2, p. 305-311, 1997.

PETERS, J. M. et al. Processed meat and risk of childhood leukemia (California, USA). **Cancer Causes and Control**, Los Angeles, v. 5, p. 195-202, 1994.

RHEMREV-BOOM, M. M. Determination of anions with capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, Emmen, v. 680, p. 675-684, 1994.

RIBEIRO, F. A. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química nova**, Campinas, v. 31, n.1, p. 164-171, 2008.

ROVIO, S.; SIRÉN, K.; SIRÉN, H. Application of capillary electrophoresis to determine metal cations, anions, organic acids, and carbohydrates in some Pinot Noir red wines. **Food chemistry**, [S. l.], v. 124, p. 1194-1200, 2011.

RUIZ-CAPILLAS, C.; ALLER-GUIOTE, P.; JIMENEZ-COLMENERO, F. Application of flow injection analysis to determine protein-bound nitrite in meat products. **Food Chemistry**, Madrid, v. 101, p. 812–816, 2007.

SANCHEZ-ECHANIZ, J.; BENITO-FERNÁNDEZ, J.; MINTEGUI-RASO, S. Methemoglobinemia and Consumption of Vegetables in Infants. **Pediatrics**, Barakaldo, v. 107, n. 5, p. 1024 -1028, 2001.

SANTOS, W. J. R. et al. Determination of nitrite in food samples by anodic voltammetry using a modified electrode. **Food Chemistry**, Campinas, v. 113, p. 1206–1211, 2009.

SAVINO, F. et al. Methemoglobinemia caused by the ingestion of courgette soup given in order to resolve constipation in two formula-fed infants. **Annals of nutrition and metabolism**, Torino, v. 50, p. 368-371, 2006.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, [S. l.], v. 52, p. 591–611, 1965.

SILVA, J. A. F. et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.

SINDELAR, J. J.; MILKOWSKI, A. L. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. **Nitric Oxide**, Madison, v. 26, p. 259–266, 2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Ed. 5ª. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical Methods**. (8th ed.). Iowa: State University Press, (Chapter 4), 1989.

SOUZA, S. V. C.; PINTO, C. T.; JUNQUEIRA, R. G. In-house method validation: application in arsenic analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, Belo Horizonte, v. 20, p. 241-247, 2007.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, Belo Horizonte, v. 552, p. 25–35, 2005.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, Campinas, v. 9, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, p. 493-511, 1997.

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, Melle, v. 23, n. 8, p.535-552, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, London, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

VITALI, L.; FÁVERE, V. T.; MICKE, G. A. A new method to determine biological sample volume by short end multiple injection capillary electrophoresis: Application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva. **Journal of Chromatography A**, Florianópolis, v. 1218, 2327–2333, 2011.

WINTER, C. W.; DAVIS, S. F. Organic foods. **Journal of food science**, Davis, v. 71, n. 9, p. 117-124, 2006.

XIONG, X.; LI, S. F. Y. Design of background electrolytes for indirect photometric detections based on a model of sample zone absorption in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Kent Ridge Crescent, v. 835, p. 169–185, 1999.

YODEN, W.J., STEINER, E.H. (1975). **Statistical manual of AOAC** - Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC.