

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**COMPARAÇÃO ENTRE A ESPECTROFOTOMETRIA E A ELETROFORESE
CAPILAR PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATOS E
NITRITOS EM LINGUIÇA**

LUCIMÉRE SILVA CALDEIRA MENDES

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2010**

LUCIMÉRE SILVA CALDEIRA MENDES

**COMPARAÇÃO ENTRE A ESPECTROFOTOMETRIA E A ELETROFORESE
CAPILAR PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATOS E
NITRITOS EM LINGUIÇA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.
Área: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.
Orientador: Prof. Dr. Leorges Moraes da Fonseca
Co-orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2010

Ficha Catalográfica

Folha de aprovação (assinaturas)

Verso (em branco) da folha de aprovação

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todas as oportunidades dela advindas.

Ao Professor Leorges, por aceitar me orientar mesmo sem ter me conhecido e por ter me apoiado nos momentos difíceis do mestrado.

Ao Professor Marcone, por sua constante ajuda e apoio, permitindo a realização deste trabalho. Pelos ensinamentos, que sempre levarei comigo.

Aos professores componentes da banca examinadora, por se dedicarem em contribuir intelectualmente para o aprimoramento deste trabalho.

Aos professores do DTIPOA-EV/UFGM, pelos valiosos ensinamentos.

Ao Dr. Ricardo e à Dra. Eugênia, por me darem a oportunidade de realização deste trabalho no LANAGRO/MG.

Ao Eduardo Esteves, por permitir que o experimento fosse realizado no setor de físico-química de produtos de origem animal.

Aos funcionários do setor: Caio, Christiane, Eduardo Carvalho, Eduardo Esteves, Flávia, Moisa, Nisney, Rute, Salomão e Sinfrônio, por toda aprendizagem, experiência e convivência.

À Moisa, pois foi através de uma conversa de amigas que surgiu a vontade de começar o mestrado.

À Daiane, um anjo enviando por Deus para me ajudar a realizar os experimentos durante a minha gravidez.

Aos colegas e irmãos acadêmicos: Adriano, Alice, Arianna, Bianca, Débora, Elisa, Fátima, Fernanda, Hugo, Isabela, Leonado, Marli e Warley, pelo companheirismo e por fazerem do mestrado dias super agradáveis.

Aos meus pais José Geraldo e Maria, pelo amor irrestrito e pelos constantes ensinamentos.

A minha irmã Luciene e meu cunhado Maurício, pelo carinho e por me apoiarem a cada conquista.

Ao meu sobrinho Diogo, que, a sua existência, é motivo mais do que suficiente para aumentar minha motivação em realizar tarefas cada vez melhores.

A minha sogra, por suas constantes orações.

Aos parentes e amigos que cruzaram meu caminho e contribuíram no aspecto motivacional para que eu chegasse até aqui com sucesso, em especial a família do meu marido, que me acolheu de braços abertos e me apoia sempre a cada conquista.

Ao meu marido Luiz André, pelo amor que me incentiva sempre, pelos valores e sonhos compartilhados. Você faz parte dessa conquista!

E a minha filha Luana, que deu um novo sentido à minha vida, me mostrando um outro significado para o Amor!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 O papel do nitrito e nitrato na alimentação.....	12
2.1.1 Linguiça tipo Calabresa.....	12
2.1.2 Métodos clássicos para análise de nitrito e nitrato.....	12
2.2 Eletroforese Capilar.....	13
2.2.1 Histórico.....	15
2.2.2 Aplicação da eletroforese capilar.....	16
2.2.4 Fatores interferentes sobre a precisão da eletroforese capilar.....	16
2.2.4.1 Capilares.....	16
2.2.4.2 Fluxo Electrosmótico – FEO.....	17
2.2.4.3 Efeito Joule.....	18
2.2.5 Tipos de Eletroforese Capilar.....	18
2.2.5.1 Eletroforese Capilar em solução livre (free solution capillary electrophoresis - FSCE) ou eletroforese capilar de zona (capillary zone electrophoresis - CZE).....	19
2.2.5.2 Eletrocromatografia Micelar ou Cromatografia Electrocinética Micelar (micellar electrokinetic capillary chromatography - MECC ou Micellar electrokinetic chromatography - MEKC).....	19
2.2.5.3 Eletroforese Capilar em Gel (capillary gel electrophoresis - CGE)	19
2.2.5.4 Focalização Isoelétrica Capilar (Capillary Isoelectric focusing – CIEF).....	20

2.2.5.5	Isotacoforese Capilar (Capillary Isotachopheresis - CITP).....	20
2.2.5.6	Análise de ânions por eletroforese capilar.....	21
2.3	Análise por espectrofotometria UV/visível.....	22
2.4	Comparação de métodos de ensaio.....	22
3.	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Equipamentos.....	22
3.2	Amostras.....	23
3.3	Etapas do processo de comparação de método.....	23
3.4	Procedimento de extração da amostra.....	23
3.5	Definição das condições de análise.....	24
3.5.1	Colunas de separação.....	24
3.5.2	Condições eletroforéticas.....	24
3.6	Análise de Robustez do método de eletroforese capilar.....	24
3.7	Análise Estatística dos dados.....	26
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Comparação de método.....	26
4.2	Pesquisa de Mercado.....	27
4.3	Robustez.....	28
4.4	Comparação de resultados.....	32
4.5	Perfil da qualidade das amostras de produtos cárneos.....	33
5.	CONCLUSÕES	33
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros para análise de robustez.....	24
Tabela 2	Testes para análise de robustez.....	25
Tabela 3	Comparação entre espectrofotometria e eletroforese capilar.....	26
Tabela 4	Resultados da análise de nitrito em lingüiça tipo calabresa, utilizando o equipamento de espectrofotômetro (uv-vis).....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Instrumentação para eletroforese capilar.....	14
Figura 2	Eletroferograma de produtos cárneos, onde os picos são: 1 nitrito, 2 nitrato e 3 tiocianato (padrão interno).....	15
Figura 3	Ilustração da superfície interna de capilar de sílica fundida.....	17
Figura 4	Figura esquemática ilustrando o fluxo eletrosmótico.....	18
Figura 5	Representação esquemática da migração de ânions por eletroforese capilar.....	21
Figura 6	Eletroferograma de lingüiça tipo calabresa.....	27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Trabalhos ilustrando o uso da eletroforese capilar para análise de nitrito e nitrato..	16
Quadro 2	Resultado de análise de robustez.....	29

RESUMO

Os nitratos e nitritos são amplamente utilizados em produtos cárneos, pois atuam na prevenção de crescimentos de bactérias e proporcionam a cor rósea nos produtos. Entretanto, a ingestão elevada e prolongada desses conservantes podem causar metahemoglobinemia, principalmente em crianças. Portanto, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento normatiza o uso de nitrato e nitrito em produtos cárneos, tolerando no máximo 200 mg/kg de nitrito em produto e de até 1 parte por mil de nitrato, separadamente.

Várias técnicas são utilizadas na detecção e quantificação de nitrito em produtos cárneos. A análise de espectrofotometria é amplamente utilizada e tem como vantagem ser um método de baixo custo, mas, em contrapartida, é um método mais trabalhoso e de alto risco para o analista.

A eletroforese capilar, que é o método alternativo proposto, é uma técnica de separação que oferece como vantagens curto tempo de análise (aproximadamente três minutos), pequeno volume de amostra necessária para injeção e simplicidade.

Este trabalho teve como objetivo realizar a comparação de métodos de ensaio entre os equipamentos de espectrofotometria UV-Visível (metodologia oficial) e a eletroforese capilar para a quantificação de nitrito em linguiças tipo calabresa.

Adicionalmente foi realizada uma pesquisa de mercado em amostras de linguiças tipo calabresa, coletadas no mercado varejista da região metropolitana de Belo Horizonte, para verificar conformidade com a concentração de nitrito em relação aos parâmetros estabelecidos legalmente. As amostras analisadas encontraram-se dentro dos parâmetros legais.

Palavras-chave: Nitrito, Espectrofotometria, Eletroforese Capilar, Lingüiça Tipo Calabresa.

ABSTRACT

Nitrates and nitrites are widely used in meat products due to their action bacteria growth and to provide the typical color in sausages. However, the continuous consumption of these preservative agents may cause methemoglobinemia in children. The maximum allowance for nitrate and nitrite use is established as 200 mg/kg of nitrite in meat products, and up to 1 part of nitrite for a thousand, therefore the Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento tolerate nitrate and nitrite use in meats products, up to a maximum of 200 mg/kg of nitrite of product, with a maximum of one part for a thousand of nitrate separately.

Several techniques are used for detection and quantification of nitrite in meat products. The spectrophotometric analysis is widely used, and has the advantage of low cost. On the other hand it is a laborious method. Capillary electrophoresis, as an alternative, method is one technique that offers the advantages of short time for analysis (approximately of 3 minutes), small volume of sample for injection and simplicity.

The objective of this work was to compare both methods – spectrophotometric (official method) and capillary electrophoresis for analysis of nitrite in “calabresa” type sausage.

Additionally samples of “calabresa” type sausage were collected in the market of Belo Horizonte metropolitan region, and analyzed for nitrite concentration. The results showed that all samples complied with the maximum legally allowed concentration of nitrite.

Keywords: Nitrite, Spectrophotometry, Capillary Electrophoresis, “Calabresa” Type Sausage.

1 INTRODUÇÃO

Os produtos cárneos são alimentos perecíveis e apresentam vida de prateleira variável em função das condições de armazenamento (OLIVEIRA et al., 2005) por isso, nitratos e nitritos são amplamente utilizados como conservantes em produtos cárneos. Além disso, o nitrato é também encontrado em vegetais de folha verde (OZTEKIN et al., 2002).

Desde 1998, a portaria 1004 da Anvisa (BRASIL, 1998), permite o uso de aditivos e determina seus limites máximos para cada categoria. Segundo a maioria dos pesquisadores a utilização dos sais de nitrito e nitrato têm por finalidade conferir cor e sabor aos produtos, além de funcionar como agente bacteriostático. Os sais de nitrito e nitrato estão naturalmente presentes no ambiente, na água e nos vegetais, sendo também utilizados como aditivo alimentar, principalmente como agente antimicrobiano em queijos e produtos cárneos. O nitrato é considerado um composto de, relativamente, baixa toxicidade, sendo que o risco que oferece à saúde humana depende de sua redução a nitrito, o qual pode conduzir a metahemoglobinemia ou formar compostos N-nitrosos (SOUZA et al., 1990).

PARDI et al., (2001), ressaltam que o nitrato quando adicionado às carnes é reduzido a nitrito, pela ação de enzimas bacterianas, que então é transformado em óxido nitroso (NO) e ácido nitroso (HNO₂). O óxido nitroso se combina com o íon Fe²⁺ da mioglobina formando a nitrosomioglobina, que após o aquecimento é transformada em nitrosohemocromo, pigmento mais estável e que dá a cor rósea aos produtos cárneos curados. Porém, o uso excessivo de nitrato e nitrito pode causar sérios danos à saúde humana, pois o nitrito combina-se com as

aminas secundárias e terciárias presentes na carne e formam as nitrosaminas que são potentes substâncias carcinogênicas. O óxido nitroso pode também se combinar com a hemoglobina formando a metahemoglobina que prejudica o transporte de oxigênio no sangue.

Os nitratos e nitritos, em doses altas, podem causar câncer. Muitas vezes, o próprio fabricante usa nitritos diretamente no alimento, o que seria um risco ainda maior para a saúde (SALOMEZ E HOFMAN, 2002).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) normatiza o uso de nitrato e nitrito em produtos cárneos e, segundo os artigos 365, 372 e 373 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (Brasil, 1997), tolera-se a presença, nos produtos cárneos prontos, de até 200mg de nitrito/kg de produto e de até uma parte por mil de nitrato separadamente. Quando os nitratos e nitritos de sódio ou de potássio são usados em qualquer combinação, o teor de nitrito no produto final não pode ultrapassar 200 mg/kg.

Concentrações superiores a 200 ppm de nitrito, que é o limite estabelecido pela legislação vigente (Brasil, 1998), têm sido detectadas em alguns produtos analisados (SOUZA et al., 1990).

Este trabalho teve como objetivo determinar as concentrações de nitrito de sódio presentes em lingüiça tipo calabresa, a fim de fazer a comparação entre o método oficial (espectrofotometria) e uma metodologia alternativa (eletroforese capilar), e verificar os teores residuais desse aditivo nos alimentos prontos para consumo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O papel do nitrito e nitrato na alimentação

Os nitritos e nitratos são utilizados nas indústrias como sal de cura e proporcionam a cor rósea dos produtos cárneos, o sabor típico de carnes curadas, além de possuírem efeito antioxidante (KILIC, 2000). Dentre os produtos frequentemente adicionados de nitrato e nitrito estão patês, presuntos, apresetados, salames, mortadelas, salsichas, lingüiças, além de outros embutidos, principalmente aqueles que possuem prazo de validade maior e que são curados e defumados (REIS, 2006).

Os nitritos e nitrato são amplamente utilizados na prevenção do crescimento do *Clostridium botulinum* (KILIC, 2000), pois o botulismo alimentar ocorre pela ingestão de toxinas pré-formadas pelo *Clostridium botulinum*, consideradas as mais potentes dentre as toxinas conhecidas. Caracteriza-se como uma doença de extrema gravidade, de evolução aguda e que provoca distúrbios digestivos e neurológicos, em consequência à ingestão de diversos tipos de alimentos. Os produtos de origem animal são freqüentemente associados aos surtos da doença, destacando-se os embutidos, derivados do leite e enlatados (CERESER et al, 2008).

Grande parte do nitrato e do nitrito se perdem durante a fabricação e as doses de emprego devem levar em conta este fato. Quando o nitrito de sódio é adicionado em carnes para cura, este reage com vários constituintes, como proteínas, gorduras e, em certas condições, com aminas secundárias. Após o processo de industrialização da carne, 10 a 20% do nitrito inicialmente adicionado ainda está presente no produto final. Os maiores fatores que influenciam o teor de nitrito residual são tempo e temperatura de processamento, pH e

tempo e temperatura de estocagem. Assim, estima-se que acima de 50% do nitrito adicionado seja consumido em 24 horas e menos de 10% permaneça depois de sete dias de fabricação. Desse modo a quantidade de nitrito consumida por uma pessoa em produtos curados é muito menor que a quantidade adicionada (KILIC, 2000; PARDI et al., 2001).

2.1.1 Lingüiça tipo Calabresa

O regulamento técnico de identidade e qualidade de lingüiça, define lingüiça calabresa como sendo um produto obtido exclusivamente de carnes suínas, curado, adicionado de ingredientes, devendo ter o sabor picante característico da pimenta calabresa submetidas ou não ao processo de estufagem ou similar para desidratação e ou cozimento, sendo o processo de defumação opcional. O que difere da lingüiça tipo calabresa é a permissão de utilização de até 20% de CMS (carne mecanicamente separada), desde que seja declarado no rótulo de forma clara ao consumidor (BRASIL, 2000)

2.1.2 Métodos clássicos para análise de nitrito e nitrato

Na determinação de nitrato em carnes e demais alimentos, o método oficial estabelecido pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 1999) é o que promove a redução do nitrato a nitrito em meio alcalino pela passagem do extrato em coluna contendo cádmio esponjoso, com posterior quantificação do nitrogênio na forma de nitrito por colorimetria (SANDERSON et al., 1991). Entretanto, esta análise apresenta como desvantagens ser

trabalhosa, necessitar do uso de vários reagentes e expor o analista a eventuais riscos de saúde pelo contato com o cádmio, pois o cádmio é um metal pesado de alta toxicidade. Adicionalmente, por causa da complexidade dos procedimentos para a análise de nitrito e nitrato, da possibilidade de interferência e dos altos limites de detecção que as técnicas clássicas oferecem, é relevante o desenvolvimento e otimização de metodologias analíticas alternativas capazes de suprir tais deficiências.

Outras técnicas são utilizadas na detecção e quantificação de nitrito em produtos cárneos. Dentre elas, destacam-se a cromatografia líquida (HPLC), cromatografia gasosa (GC), eletroforese capilar (EC), espectrofotometria UV-Visível, colorimetria, destilação e potenciometria, (SAH, 1994; SALOMEZ e HOFMAN, 2002).

Com relação à análise de nitrato e nitrito em produtos cárneos por espectrofotometria UV-Vis, suas principais vantagens são baixo custo, especificidade, e simplicidade para desempenho analítico (PRINGUEZ et al, 1995). Entretanto, segundo OZTEKIN et al (2002), a espectrofotometria é um método trabalhoso, que demanda muito tempo e material por parte do analista.

Por outro lado, técnicas de separação (HPLC, GC, CE) em comparação com as demais apresentam como vantagem principal a determinação rápida e simultânea de nitrato e nitrito. Contudo, deve-se ressaltar que este é um processo analítico de custo considerável, uma vez que a infraestrutura analítica envolve o uso de solventes caros, no caso de HPLC, e sistemas de gases específicos, no caso da GC, além do custo do equipamento.

2.2 Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos neutros iônicos ou ionizáveis, mediante aplicação de um campo elétrico da ordem de kV (fonte de alta tensão com corrente contínua) a um tubo capilar preenchido com uma solução de eletrólito (tamponada ou não) conveniente (TAVARES, 1996).

Na eletroforese capilar, o tubo capilar pode ser de vidro, teflon ou sílica fundida, revestido externamente por polimida ou poliacrilato, o que proporciona ao capilar resistência mecânica e maleabilidade. Internamente, os capilares de sílica fundida são constituídos por grupos silanóis, que conferem a técnica uma importante propriedade que é a presença do fluxo eletroosmótico, o qual contribui diretamente para a aquisição de análises com alta resolução, alta eficiência e curto tempo de análise. Do ponto de vista operacional, uma pequena porção do revestimento externo é removida, a fim de se formar uma janela para detecção em linha na própria coluna, a qual é alinhada ao centro óptico do detector (LANDERS, 2008).

Os capilares são, tipicamente, de 25 a 100 cm de comprimento com 15 a 100 μm de diâmetro interno. São acomodados dentro de cartuchos apropriados com temperatura controlada a fim de auxiliar na dissipação do calor gerado devido ao efeito Joule, que é o calor gerado pela passagem de corrente através do meio condutor, formando gradiente de temperatura. O controle de temperatura pode ser feito de duas maneiras: passagem de ar forçado ou um líquido refrigerante (LANDERS, 2008). Os volumes de injeção variam de 10,0 a 100,0 nL, sendo o modo de injeção hidrodinâmico (vácuo ou pressão positiva) o mais empregado. Outra alternativa é a injeção eletrocinética mediante aplicação de pequena voltagem (em torno de 5,0 kV). No caso da injeção

eletrocínética, os solutos neutros são eletrosmótico, ao passo que os solutos carregados irão migrar para dentro do capilar levando-se em consideração as contribuições do fluxo eletrosmótico e da mobilidade eletroforética, simultaneamente.

arrastados pelo fluxo. A injeção hidrodinâmica é usualmente mais precisa que a eletrocínética porque é baseada estritamente na transferência de volume (TAVARES, 1996).

A Figura 1 mostra o esquema de blocos para a instrumentação utilizada em eletroforese capilar.

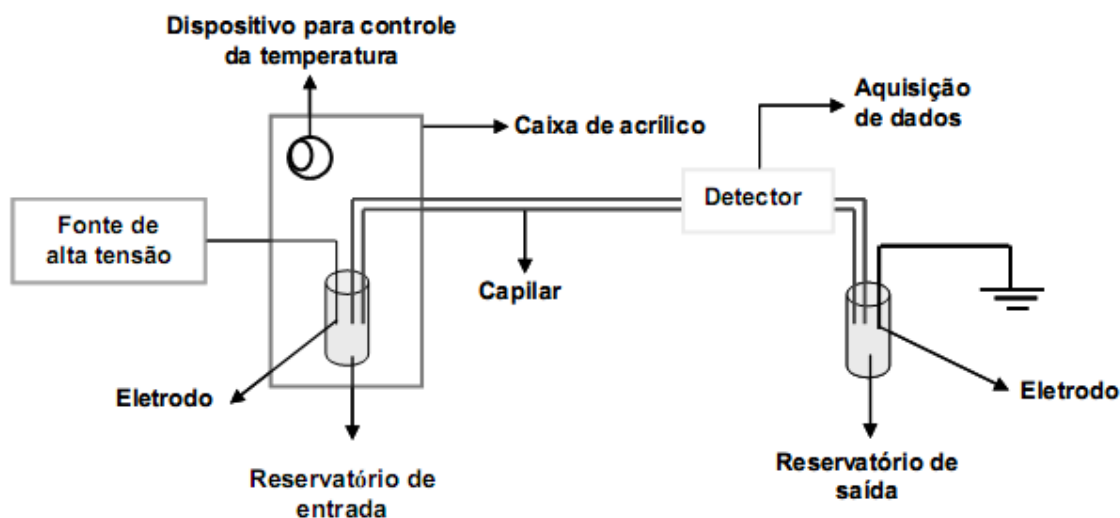


Figura 1- Instrumentação para eletroforese capilar (SOARES, 2007).

A eletroforese capilar tem se mostrado como uma boa alternativa para a análise de íons, pois apresenta como vantagens frente aos demais procedimentos, o reduzido volume de amostra necessário para quantificação dos íons, a alta eficiência e precisão, o curto tempo de análise, a baixa exposição do analista a riscos de saúde, rapidez na obtenção dos resultados, alta taxa de amostragem, praticidade da técnica e, muitas vezes, a ausência de qualquer pré-tratamento da amostra antes da injeção do analito (REIS, 2006). Normalmente a análise de ânions rápido e com baixa absorvidade molar no UV-Vis, é realizada sob fluxo eletrosmótico invertido e detecção indireta mediante a adição ao eletrólito de corrida de agentes modificadores de fluxo, como por

exemplo o brometo de cetil tetrabutílamônio (CTAB), e espécies cromóforas ou tampão cromóforo. Especificamente no caso do nitrito, o qual apresenta transição eletrônica entre par de elétrons não ligantes e orbital p_π antiligante, é possível a realização de análise por detecção direta por UV-Vis em 210 nm (TAVARES, 1996).

O gráfico gerado pelo detector, com diferentes tempos em função de resposta do detector é denominado eletroferograma.

A Figura 2 mostra um eletroferograma obtido na análise simultânea de nitrito e nitrato em produtos cárneos usando a detecção direta por UV-Vis.

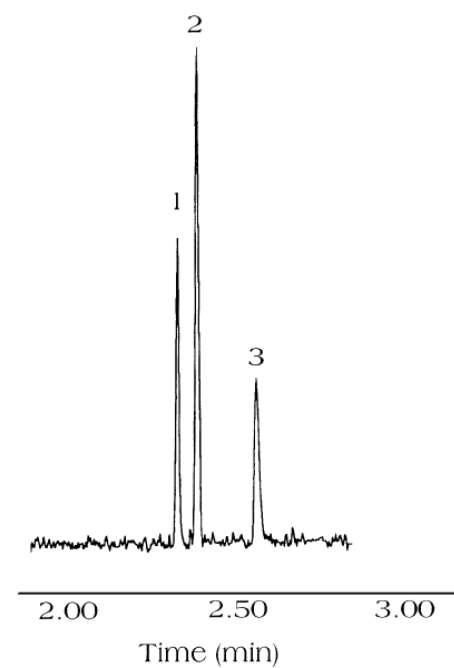


Figura 2 – Eletroferograma de produtos cárneos, onde os picos são: 1 nitrito, 2 nitrato e 3 tiocianato (padrão interno) (OZTEKIN, 2002).

As principais vantagens da EC em relação às outras técnicas de separação que operam em meio líquido são: rapidez, versatilidade, alto poder de separação (resolução), pequena quantidade de amostra injetada e gasto mínimo de reagentes (JAGER et al, 2001). A título de ilustração, alguns trabalhos reportados na literatura evidenciam algumas aplicações da técnica em matrizes complexas como, por exemplo: identificação das proteínas do leite (JONG et al, 1993), estudo da formação de caseinomacropetideo em leite UHT (RECIO et al, 1996), determinação de análise de citrato e fosfato em leite (IZCO et al, 2003), análise de ácidos graxos (OLIVEIRA et al, 2003) e determinação da acidez do azeite de oliva (BALESTEROS et al, 2007).

2.2.1 Histórico

O termo eletroforese foi criado em 1909 por Michaelis, embora o experimento pioneiro

tenha sido realizado pelo químico Arne Tiselius, em 1937. Seu experimento mostrava a separação de proteínas – albumina e α , β - globulina – mudando o limite de eletroforese; foi o primeiro uso da análise eletroforética para ações biológicas das moléculas. Por este trabalho, recebeu o prêmio Nobel em 1948. No entanto, esta análise foi limitada pela incompleta separação de proteínas, pelo volume relativamente grande de amostra e pela necessidade de um campo elétrico baixo, devido ao efeito Joule (LANDERS, 2008). Em 1967, Hjertén conseguiu obter sucesso em eletroforese de zona livre usando tubos de quartzo de 3mm de diâmetro e 36 cm de comprimento, e voltagem de 2,5 a 3 Kv. Em 1974, Pretorius e colaboradores demonstraram o efeito do fluxo eletrosmótico, salientando as vantagens deste modo, em comparação aos métodos tradicionais de fase móvel em cromatografia. Nesta época, Virtanen

advogava as vantagens do uso de tubos de

para separações eletroforéticas. Essa tendência em breve iria culminar, em 1979, na Holanda com a primeira demonstração de eletroforese em zona em tubos de teflon de pequeno diâmetro (200µm) (TAVARES, 1996). Em 1981 Jorgenson e Lukacs definiram eletroforese em micro tubos capilares (LANDERS, 2008).

2.2.2 Aplicação da eletroforese capilar

A análise dos íons está descrito nos trabalhos de MARSHALL e TRENERRY (1996) para análise de alimentos. Outras

pequenos diâmetros (50-200µm)

aplicações incluem compostos biológicos (BJERGEGAARD et al., 1995), amostras de água (OEHRLE, 1996) e fluidos biológicos (BORIES et al., 1999). Todos estes autores ressaltaram a praticidade e rapidez da técnica.

O Quadro 1 resume alguns trabalhos utilizando a eletroforese capilar, realizados no período de 1995 a 2007, levando em consideração o tipo de detecção, o limite de detecção, o tempo de migração e a aplicação das metodologias.

Quadro 1- Trabalhos ilustrando o uso da eletroforese capilar para análise de nitrito e nitrato

Tipo de detecção	Limite de detecção (µg/L)		Tempo de migração (min)		Aplicação	Referência
	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito		
Detecção Direta A=235nm	41,4	16,74	3,85	3,52	Material Biológico ¹	Bergegaard et al (1995)
Detecção Indireta UV A= 254nm	4000	4000	5,5	5,5	Água Potável	Oehrle (1996)
Detecção Direta UV A= 214nm	460	—	4,0 ± 0,8	3,9 ± 0,8	Fluidos Biológicos ²	Bories et al (1999)
Detecção Direta UV A= 210nm	0,099	0,105	2,3	2,4	Produtos cárneos e vegetais	Oztekin et al (2002)
Detecção Direta UV A=210nm	0,034 a 1,84	—	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5	Água de Córrego	Soares (2007)

1-Amostras de sangue e leite

2-Amostras de sangue e urina

2.2.4 Fatores interferentes sobre a precisão da eletroforese capilar

2.2.4.1 Capilares

Segundo LANDERS (2008), as condições dos capilares têm que ser observadas, pois podem ter impacto na eficiência e

reprodutibilidade das análises de EC. O tratamento do capilar antes, durante e após a separação eletroforética é crucial. Este autor faz as seguintes recomendações: a) Quando necessário, o capilar deve ser cortado com equipamento próprio, geralmente de cerâmica. A janela de detecção do capilar deve ser feita usando uma chama para retirar

a cobertura de polimida, cujo tamanho é de aproximadamente 0,3 cm; b) Quando se tratar de capilar sem recobrimento interno, antes de se usar um capilar pela primeira vez, deve-se passar de 5-10 volumes do capilar de 100 mM NaOH, depois 5-10 volumes de água e 3-5 volumes do tampão de separação. Com relação a capilares com recobrimento interno, deve-se seguir as instruções do fabricante; c) Os capilares devem ser estocados em um tampão apropriado ou solvente.

Segundo OLIVEIRA (2003) o capilar de sílica fundida utilizado em EC possui vários grupos silanóis (Si-OH) de caráter ácido. Acima de $\text{pH} \cong 2,0$ esses grupos são ionizados e a superfície interna do capilar torna-se negativamente carregada, surgindo na solução, próxima à superfície, uma distribuição espacial não homogênea de carga, conhecida como dupla camada elétrica.

A Figura 3 ilustra a superfície interna do capilar e as diferentes dissociações dos grupos silanóis.

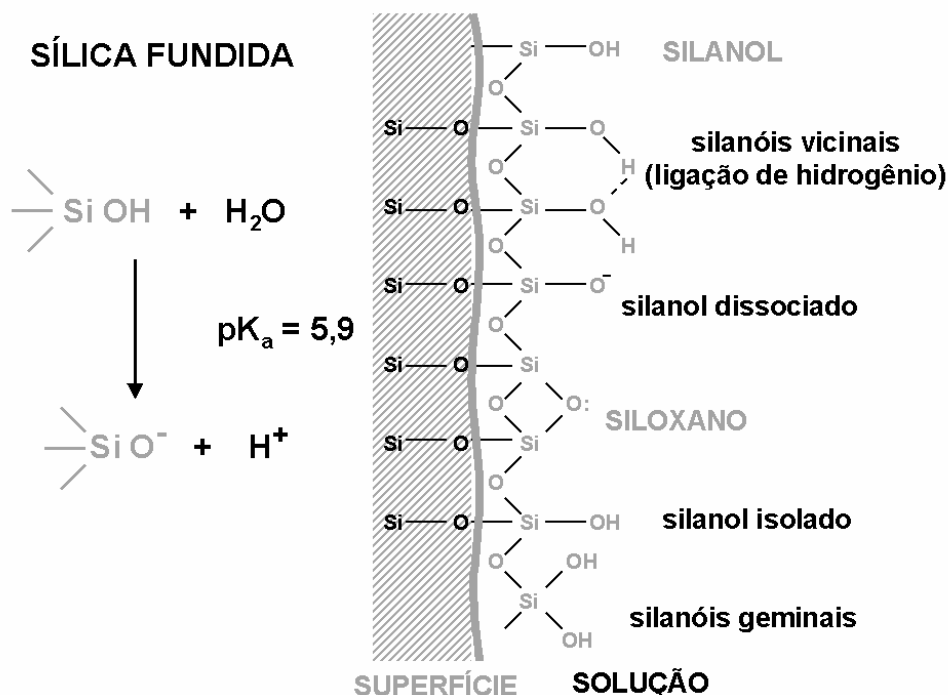


Figura 3: Ilustração da superfície interna de capilar de sílica fundida (TAVARES, 1996).

2.2.4.2 Fluxo Eletroosmótico – FEO

A existência do fluxo eletroosmótico tem importantes implicações na eletroforese capilar. O fluxo de solução contribuiu significativamente para a automação da técnica, permitindo a introdução de amostra e detecção diretamente no capilar. Quando a velocidade eletroosmótica é de grande magnitude, o fluxo é responsável pela

condução dos solutos, sem distinção de carga, em direção ao detector. As características de alta eficiência da técnica estão, em parte, vinculadas ao perfil radial da velocidade eletroosmótica (TAVARES, 1996).

Uma forma efetiva de alterar, ou mesmo inibir o fluxo eletroosmótico, consiste em modificar a composição química do material

do capilar e, portanto, a densidade de carga ilustrado na Figura 4. Além de sílica fundida, outros materiais têm sido testados, como vidro e teflon. Outra possibilidade consiste em alterar a natureza da superfície interna do capilar, através de revestimentos físicos e/ou métodos de derivatização

superficial, como é química e, finalmente, aplicação de um campo elétrico externo, transversal ao capilar, que é considerada a melhor maneira de manipular o fluxo eletroosmótico (TAVARES, 1996; LANDERS, 2008).

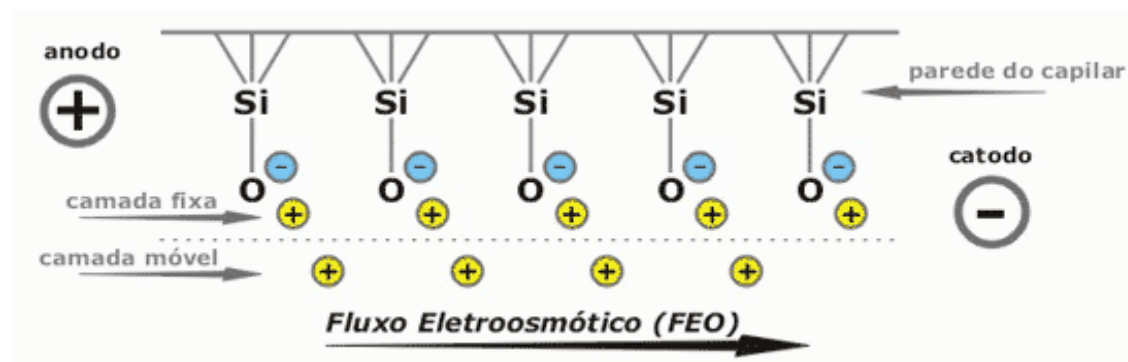


Figura 4 – Figura esquemática ilustrando o fluxo eletroosmótico
 Fonte: <http://www.chemkeys.com/bra/md/mds> Acessado 16/04/2010

2.2.4.3 Efeito Joule

A maior limitação para a rapidez, eficiência e aumento de escala de separações eletroforéticas, é a falta de habilidade de dissipar calor, causada pela passagem de corrente através do meio condutor (efeito Joule). O calor gerado uniformemente através do meio condutor é dissipado somente pelas extremidades do recipiente, gerando gradientes de temperatura, que por sua vez induzem a gradientes de densidade, e estes podem causar convecção. Outro fator desfavorável decorrente do efeito joule é uma introdução de uma dependência espacial para a mobilidade dos solutos. As moléculas localizadas na região central do meio de separação irão migrar mais rapidamente que as moléculas localizadas nas bordas, causando a dispersão de zona. Adicionalmente, se a temperatura do meio se torna muito alta, pode haver um comprometimento da integridade da amostra (TAVARES, 1996).

Uma solução simples para o problema do efeito Joule em eletroforese é a utilização de tubos com dimensões capilares. A geometria do capilar favorece a dissipação do calor. A remoção eficiente do calor através das paredes do capilar praticamente elimina a convecção, sendo possíveis campos elétricos substancialmente maiores. Outro artifício utilizado para auxiliar a dissipação de calor, é o acondicionamento do capilar no interior de cartuchos com sistema de refrigeração. Nestas condições as bandas se aproximam do limite teórico de serem alargadas apenas por difusão longitudinal. Em casos favoráveis, aproximadamente um milhão de pratos podem ser obtidos, fazendo da eletroforese capilar a técnica eletroforética de maior eficiência (TAVARES, 1996).

2.2.5 Tipos de Eletroforese Capilar

Segundo Tavares (1996), existem vários modos de separação, com mecanismos singulares e seletividade característica possíveis: zona, gel, isotacoforese, focalização isoelétrica e eletrocromatografia

micelar.

2.2.5.1 Eletroforese Capilar em solução livre (free solution capillary electrophoresis - FSCE) ou eletroforese capilar de zona (capillary zone electrophoresis - CZE)

Este tipo de EC é um dos modos de separação eletroforética mais usado na prática, provavelmente em razão da facilidade de sua implementação e otimização das condições experimentais. Em CZE, o tubo capilar é simplesmente preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes. A separação ocorre como resultado de duas estratégias: maximizar as diferenças entre as modalidades efetivas dos solutos e minimizar as causas de alargamento das zonas. É aplicável a uma grande variedade de solutos, incluindo íons inorgânicos, compostos orgânicos de baixa massa molecular e biomoléculas com alguns milhares de Daltons (TAVARES, 1997).

O mecanismo de separação de CZE é baseado nas diferenças da razão massa/carga dos solutos em um dado pH. Nesta técnica todos os compostos neutros são varridos, e as espécies carregadas se movem para o eletrodo correspondente, ou seja, os cátions migram para o cátodo e os ânions para o ânodo. A velocidade de seus movimentos depende do seu tamanho e do número de cargas, as moléculas menores com um grande número de cargas movem-se mais rapidamente do que os compostos maiores ou menos carregados, (LANDERS, 2008).

2.2.5.2 Eletrocromatografia Micelar ou Cromatografia Eletrocinética Micelar (micellar electrokinetic capillary chromatography - MECC ou Micellar electrokinetic chromatography - MEKC)

É uma versão modificada da eletroforese capilar em que agentes tensoativos iônicos, em condições apropriadas à formação de

micelas são adicionados ao eletrólito de corrida, proporcionando assim, um sistema cromatográfico de duas fases. O eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada eletroosmoticamente pela ação do campo elétrico, enquanto que as micelas representam a fase secundária, ou pseudo-estacionária, a qual é transportada por uma combinação de eletroforese e eletroosmose. A participação diferenciada de solutos neutros entre estas duas fases é responsável pela seletividade da separação. Muito embora a eletrocromatografia micelar tenha sido idealizada para separar solutos neutros, ela pode também auxiliar a separação de compostos iônicos, e tem sido amplamente empregada como tal (TAVARES, 1997).

As moléculas neutras não eram separadas por eletroforese até ser desenvolvida a eletrocromatografia micelar, onde o analito neutro ganha uma mobilidade eletroforética quando é incorporado a uma micela. A MECC introduziu o perfil cromatográfico na eletroforese capilar, sendo utilizada para uma grande escala de analitos, principalmente para moléculas menores. Esta técnica pode ser facilmente utilizada, sendo necessário introduzir micelas iônicas na solução eletroforética ou na solução do eletrólito (LANDERS, 2008).

2.2.5.3 Eletroforese Capilar em Gel (capillary gel electrophoresis - CGE)

A eletroforese capilar em gel tem sido extensivamente utilizada na separação de compostos de caráter iônico e alta massa molecular. Neste tipo de eletroforese, os solutos migram através de uma estrutura polimérica, sendo impedidos em seu percurso, de acordo com seu tamanho, processo este conhecido como peneiramento. A restrição seletiva na passagem de moléculas de diferentes

tamanhos pela matriz polimérica é, portanto ocorrer. Géis são estruturas porosas, em que um componente fluido é imobilizado numa rede polimérica. As cadeias de um polímero podem ser interligadas por processos físico-químicos definindo os géis como químicos, e/ou emaranhados mecanicamente (géis físicos ou polímeros enovelados). Mas a implantação da tecnologia para fabricação de capilares preenchidos com gel apresentou problemas como o encolhimento do polímero durante o processo de fabricação no interior do capilar, até que em um novo método de fabricação de capilar com gel surgiu em 1987, com um pré-tratamento do capilar com o reagente 3-metacriloxi-propil-trimetoxi-silano. Este reagente tem dupla finalidade: elimina o fluxo eletroosmótico através de uma ligação covalente com o grupo silanol da superfície capilar e evita a extrusão do gel (TAVARES, 1997). Este tipo de eletroforese capilar é também muito usado para separar polímeros, como por exemplo, ácidos nucléicos e ácido hialurônico (LANDERS, 2008).

2.2.5.4 Focalização Isoelétrica Capilar (Capillary Isoelectric Focusing – CIEF)

A Eletroforese capilar por focalização Isoelétrica é limitada à separação de compostos anfotéricos em gradiente de pH. Compostos anfotéricos possuem em sua estrutura grupos funcionais com caráter ácido e básico. A protonação e/ou dissociação destes grupos é responsável pela variação da carga efetiva da molécula em função do pH e, portanto, o pH do meio governa a magnitude da mobilidade eletroforética. Compostos deste tipo são caracterizados por um ponto isoelétrico, que corresponde ao valor do pH em que a carga efetiva do composto é nula. Para efetuar a separação, o capilar é inicialmente preenchido como uma mistura de anfólitos, geradores de gradiente no intervalo de pH apropriado, e também dos solutos sob investigação. Inicialmente, a solução contida no capilar está uniformemente distribuída e

condição necessária para a separação possui um pH único. Uma voltagem pequena é então aplicada ao sistema. Por ação do campo elétrico, solutos e anfólitos sofrem alteração de carga ao atravessar regiões de diferentes pH, e eventualmente começam a separar-se em bandas individuais. A migração dos anfólitos causa um aumento de pH do eletrólito próximo ao catodo, enquanto que o pH da região anódica declina, assim que os anfólitos de baixo pI (negativamente carregado) migram naquela direção. A migração individual prossegue até que um estado estacionário é estabelecido, onde cada composto adquire carga efetiva nula, e atinge sua posição final. O pH equivalente a esta posição é igual ao pI do composto em questão. Neste ponto, o composto cessa de migrar eletroforicamente. Essa etapa é conhecida como focalização (TAVARES, 1997).

A focalização isoelétrica capilar é um método poderoso para caracterizar proteínas e outros biopolímeros, com separação baseada na diferença do ponto isoelétrico. Este tipo de eletroforese capilar apresenta algumas vantagens com relação às outras, tais como: o grande volume de amostra introduzido no capilar conduz a um aumento da sensibilidade; é feita a medida de uma propriedade molecular importante, o ponto isoelétrico e um grande número de fatores podem ser modificados para melhorar a definição (LANDERS, 2008).

2.2.5.5 Isotacoforese Capilar (Capillary Isotachopheresis - CITP)

A isotacoforese é uma ferramenta analítica importante, tendo sido empregada na separação e preparo de drogas, na avaliação de alimentos e amostras ambientais, além de muitas outras aplicações significativas. A isotacoforese possui duas características marcantes: a existência de um estado estacionário, em que todas as bandas migram com a mesma velocidade, e o fato de que há bandas com diferentes gradientes

de potencial, de tal forma que todos os Solutos eventualmente migram com velocidades idênticas, com a velocidade isotacofóretica (TAVARES, 1997).

Em isotacoforese, a amostra é inserida entre duas soluções, o eletrólito líder e o eletrólito terminador. Ambos, cátions e ânions, podem ser analisados por este modo, entretanto em misturas distintas. Quando o campo elétrico é estabelecido, diferentes gradientes de potencial envolvem em cada banda, de tal forma que todos os cátions eventualmente migram com velocidade constante e única. Em regiões onde cátions de menor mobilidade estão presentes, o campo elétrico é mais intenso (TAVARES, 1996).

2.2.5.6 Análise de ânions por eletroforese capilar

A eletroforese capilar de zona é a técnica usada para separar cátions e ânions. O fluxo eletroosmótico é responsável pela condução dos solutos até o detector, permitido assim

análises simultâneas de amostras contendo solutos catiônicos, neutros e aniônicos. A figura 5 exemplifica a separação sob fluxo eletroosmótico normal, fluxo direcionado ao catodo, e polaridade positiva na extremidade do capilar onde é feita a injeção da amostra. Este tipo de análise somente é possível no caso de ânions lentos (aromáticos, por exemplo), cuja mobilidade é menor que a mobilidade eletroosmótica. Se os ânions são rápidos ou moderadamente lentos, eles deixam a coluna assim que o campo elétrico é estabelecido e nunca atingem o detector. A inversão da polaridade, figura 5b, torna viável a análise de ânions rápidos. A situação ideal para análise de qualquer ânion é apresentada na figura 5c, onde uma dupla camada elétrica constituída de ânions é organizada na interface superfície – solução. Uma última possibilidade de análise, que também se aplica a ânions de qualquer natureza é apresentada na figura 5d, onde a separação é conduzida sob fluxo suprimido, em capilares especiais com revestimento interno.

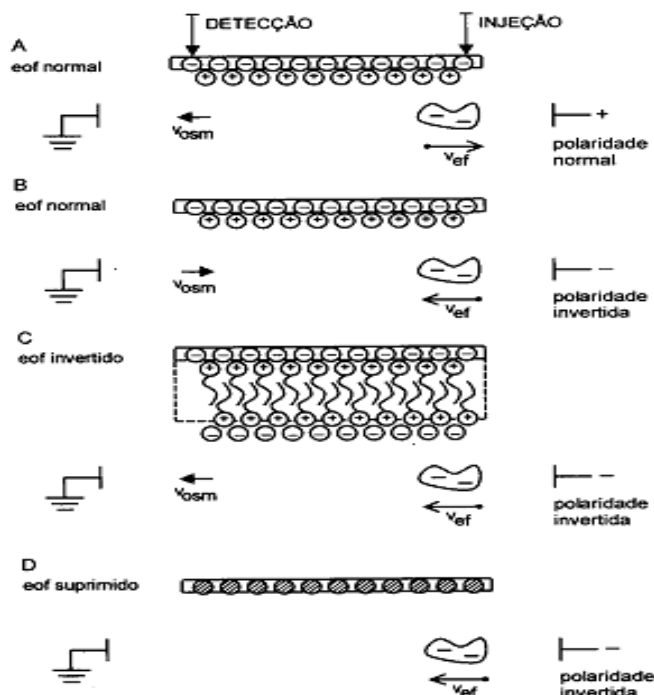


Figura 5 – Representação esquemática da migração de ânions por eletroforese capilar (TAVARES, 1997).

2.3 Análise por espectrofotometria UV/visível

A espectrofotometria é um processo que utiliza a luz para medir as concentrações químicas. Em relação à energia, é mais conveniente pensar na luz como partículas chamadas fótons, quando uma molécula absorve um fóton, a energia da molécula aumenta e dizemos que a molécula é promovida para um estado excitado. A luz visível e a radiação ultravioleta provocam a promoção dos elétrons para orbitais de maior energia, a luz oriunda de uma fonte contínua passa por um monocromador, que seleciona uma estreita faixa de comprimento de onda do feixe incidente. Essa luz monocromática passa pela amostra e a energia radiante da luz emergente é medida. Na espectrofotometria UV/visível, a amostra é geralmente colocada numa cubeta. O espectrofotômetro pode possuir um feixe simples ou um feixe duplo, nos dois casos é preciso uma amostra de referência contendo o solvente puro. No sistema de feixe simples, para cada amostra colocada no aparelho deve ser colocada novamente a amostra referência, no caso do sistema de feixe duplo, a amostra referência fica no equipamento durante todas as análises necessários (HARRIS, 2001).

A espectrofotometria tem sido amplamente utilizada para detecção e quantificação de nitrato e nitrito em produtos cárneos, vegetais, legumes, água e sucos (PRINGUES et al, 1995).

2.4 Comparação de métodos de ensaio

A avaliação de comparação de métodos consiste na comparação dos resultados obtidos utilizando um método interno com os resultados conseguidos por meio de um

método de referência. O objetivo é estudar o grau de proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, ou seja, avaliar a exatidão do método interno com o de referência. As análises são efetuadas com réplicas utilizando os dois métodos de ensaio, em separado, sobre as mesmas amostras, numa faixa restrita de concentrações ou em toda faixa de concentrações em que se pretende validar o método (INMETRO, 2007). Esta abordagem assume que a incerteza do método de referência é conhecida (RIBANI et al, 2004; SOUZA, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Setor de Físico-Química de Produtos de Origem Animal do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), em Pedro Leopoldo (MG), no período de agosto de 2009 a fevereiro de 2010.

Para a técnica de eletroforese capilar utilizou-se o método segundo Soares (2007) e o método espectrofotométrico foi realizado segundo metodologia oficial (BRASIL, 2000).

3.1 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

Eletroforese Capilar:

Equipamento comercial de CE modelo Agilent CE, equipado com fonte de alta tensão (± 25 kV), detector DAD (diode array), com controle de temperatura no interior do cartucho por passagem de ar forçado e programada para controle, aquisição e tratamento de dados

ChemStation release 6.0. A injeção e o condicionamento do capilar foram realizados hidrodinamicamente sob pressão (mbar) pelo tempo necessário.

Espectrofotômetro UV – VIS:

Equipamento comercial de espectrofotômetro modelo Genesys 10uv, equipado com duplo feixe; Cubeta de Quartzo (10mm) e sistema óptico: split-beam.

3.2 Amostras

Foram utilizadas amostras de lingüiça tipo calabresa coletadas no mercado da região metropolitana de Belo Horizonte sendo 1.000g de cada marca de lingüiça. Todas as amostras utilizadas foram obtidas em estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (S.I.F.).

3.3 Etapas do processo de comparação de método

Foram coletadas no mercado 06 marcas de lingüiça tipo calabresa, para serem utilizadas nas análises de comparação entre o método oficial de espectrofotometria UV – VIS com o método em eletroforese capilar.

3.4 Procedimento de extração da amostra

O procedimento para a extração da amostra foi segundo a metodologia oficial (BRASIL, 1999). Este foi detalhado a seguir para demonstrar o momento exato onde foi retirada a alíquota para a injeção em eletroforese capilar.

Foram dissolvidos em béquer de 300 mL, 10 g de lingüiça calabresa com 100 mL de água deionizada e destilada a 60°C. Após a

dissolução 5 mL de solução de tetraborato de sódio a 5% foram adicionados, e o material homogeneizado com bastão de vidro. O béquer com a solução foi colocado em banho de água fervente por 15 minutos e depois resfriado em temperatura ambiente. Logo após, o conteúdo do béquer foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 250 mL com a ajuda de funil de plástico e bastão de vidro. Após a transferência foram adicionados cinco mL de ferrocianeto de potássio a 15% e cinco mL de solução de acetato de zinco a 30%, com agitação por rotação após a adição de cada reagente. O volume foi completado com água destilada e deionizada. A solução foi filtrada em papel de filtro qualitativo com a ajuda de um funil de vidro para um erlenmeyer de 300 mL. Neste momento a amostra foi coletada para injeção no equipamento de eletroforese capilar.

Uma alíquota de 20 mL do filtrado foi transferida para um erlenmeyer de 125mL, após a transferência foram adicionados 5 mL de solução tampão pH 9,6 – 9,7 (ácido clorídrico e hidróxido de amônia) e aproximadamente 20g de cádmio esponjoso, lavando as paredes com o mínimo de água possível colocando-se a seguir no agitador por 15 minutos, sendo o sobrenadante filtrado em papel de filtro qualitativo e recolhido diretamente em balão volumétrico de 100mL e completando-se o volume com água destilada deionizada. Dez mililitros do filtrado foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL e adicionados cinco mL de solução tampão pH 9,6 – 9,7 e cinco mL de solução de sulfanilamida a 0,5%. Após agitação por três minutos. 3 mL de solução de cloreto de alfa-naftilenodiamina a 0,5% foram adicionados. Após a homogeneização o volume foi completado com água destilada e

deionizada. Após armazenamento por 30 minutos ao abrigo da luz, foi feita a leitura no espectrofotômetro a 540nm. O resultado obtido refere-se ao teor de nitrito total.

3.5 Definição das condições de análise

3.5.1 Condições eletroforéticas

As condições eletroforéticas apresentadas a seguir foram segundo Soares (2007), fazendo-se uma adaptação na voltagem de -20kv para -18kv e no diâmetro do capilar de 75µm para 50µm.

O tempo de injeção foi de 10 segundos a 50 mbar, temperatura de 30°C, voltagem 18kV (negativa), detecção direta por UV em 210 nm. No começo do dia, foi realizado flush de 5 minutos com NaOH 1,00 mol L⁻¹, 5 minutos de água destilada e deionizada e 15 minutos de eletrólito condutor (Tris/HCl 100mmol L⁻¹). Entre as corridas, realizou-se fluxo de NAOH 0,2 mol L⁻¹ por dois minutos, 2 minutos com água destilada e

deionizada e 2 minutos com eletrólito condutor (Tris/HCl 100mmol L⁻¹).

3.5.2 Colunas de separação

Utilizou-se capilar de sílica fundida com revestimento externo de polimida obtido da Agilent Technologies, com dimensões do capilar de 50 µm de diâmetro interno. A janela de detecção foi feita por remoção da polimida a 8,5 cm do início do capilar, sendo 48,5 cm de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo.

3.6 Análise de Robustez do método de eletroforese capilar

Para avaliar a capacidade da metodologia em resistir a pequenas variações do meio ambiente e/ou alterações na metodologia, foram realizados os testes de robustez conforme a Tabela 1. Para esta análise, uma mesma amostra foi preparada e colocada em 19 frascos diferentes (Tabela 1) e distribuídos de forma aleatória.

Tabela 1 – Parâmetros para análise de robustez

Fatores	Níveis experimentais		
	(-)	(0)	(+)
1- Voltagem (kv)	-17	-18	-19
2- Temperatura (°C)	28	30	32
3- Comprimento de onda (nm)	208	210	212
4- Tampão Tris/HCL (mmol L ⁻¹)	95	100	105

Os parâmetros da análise de robustez foram voltagem, temperatura, comprimento de

onda e tampão, distribuídos conforme a Tabela 1.

Tabela 2 – Testes para a análise de robustez em amostras de lingüiça tipo calabresa analisadas por eletroforese capilar

Ensaio	Voltagem (kv)	Temperatura (°C)	Comprimento de onda (nm)	Concentração do Tampão (mmol L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

O experimento foi realizado em triplicata com as 19 amostras distribuídas aleatoriamente em 3 grupos de análise, sendo o primeiro a metodologia original

(grupo controle: 0) onde utilizou a voltagem: -18 kv; Temperatura: 30°C; Comprimento de onda: 210nm e Tampão Tris/HCL na concentração de 100 mmol L⁻¹. No segundo

(grupo: -1) foram modificados os parâmetros para voltagem: -17 kv; Temperatura: 28°C; Comprimento de onda: 208nm e Tampão Tris/HCL na concentração de 95 mmol L⁻¹ e no terceiro (grupo: +1) os parâmetros foram modificados para voltagem: -19 kv; Temperatura: 32°C; Comprimento de onda: 212nm e Tampão Tris/HCL na concentração de 105 mmol L⁻¹.

3.7 Análise Estatística dos Dados

A análise estatística dos dados foi realizada através do programa SPSS 8.0 for Windows Statistical Program. O teste estatístico utilizado para comparação entre os métodos desenvolvido por espectrofotometria e eletroforese capilar foi o teste t pareado paramétrico, uma vez que se trata de amostra heterogênea. O pressuposto de normalidade para a diferença entre os valores em cada nível analisado foi verificado pelo teste Shapiro-Wilk para um intervalo de 95% de confiança. Caso o pressuposto de normalidade tivesse sido violado, deveria ter sido utilizado um teste t pareado não-paramétrico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comparação de método

Tabela 3 - Comparação entre espectrofotometria e eletroforese capilar em amostras de lingüiça tipo calabresa

Amostra	Espectrofotômetro	Eletroforese Capilar
	mg/kg	mg/Kg
1	0,948	0,645
2	0,957	1,021
3	1,397	1,661
4	0,784	0,760

Foi realizada a comparação entre o método oficial (espectrofotometria UV-Visível) e a técnica alternativa (eletroforese capilar) para análise de nitrito em seis amostras de embutidos de lingüiça tipo calabresa preparadas em triplicatas genuínas, isto é, cada amostra foi preparada 3 vezes separadamente, com seis amostras totalizando 18 análises. Uma vez que as amostras apresentam comportamento heterogêneo, pois cada preparação de amostra foi realizada com ingredientes distintos, o teste de comparação a ser realizado é o teste t pareado. A tabela 3 apresenta os resultados para cada técnica com as considerações estatísticas. Foi verificada a normalidade do conjunto de observações mediante o teste de Shapiro-Wilk, sendo evidenciado comportamento de normalidade no intervalo de 95% de confiança ($p > 0,05$). Em relação à comparação entre os métodos através do teste t pareado, não foi evidenciado diferenças significativas entre os métodos no intervalo de 95% de confiança ($p > 0,05$). Logo, ambas as metodologias não são significativamente diferentes entre si para o conjunto de medidas consideradas na Tabela 3.

5	2,187	2,257
6	0,794	0,818

Shapiro-Wilk p-valor: 0,519
 Teste t pareado p-valor: 0,850

A quantificação por eletroforese capilar foi realizada por adição de padrão com um incremento de padrão em duplicata autêntica. A equação abaixo foi utilizada nos cálculos:

$$C_x = (S1C_sV_s) / (S2V_t - S1V_x)$$

Onde:

- S1- Área do pico do nitrito na amostra
- S2- Área do pico do nitrito na amostra mais a adição de padrão

C_s- Concentração de nitrito na solução estoque

V_s- Volume de padrão adicionado

V_t- Volume total (V_x + V_s)

V_x- Volume de amostra

O eletroferograma apresentado na figura 6 mostra o perfil eletroforético de nitrito e nitrato em uma das amostras de lingüiça tipo calabresa .

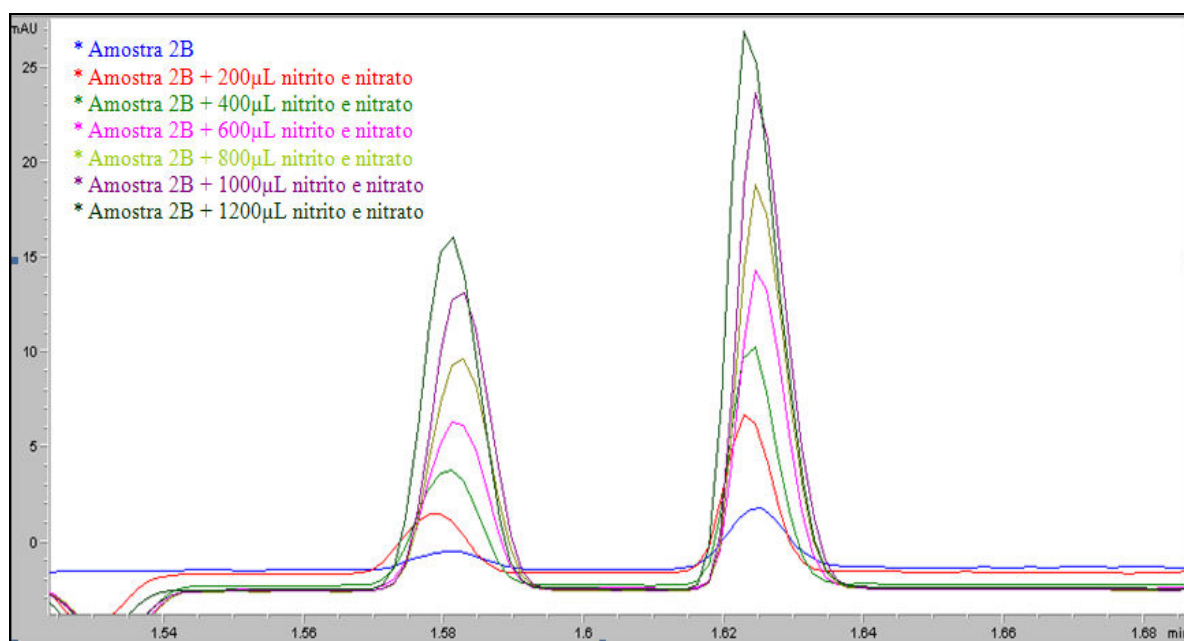


Figura 6 – Eletroferograma de lingüiça tipo calabresa

Estes resultados evidenciam igualdade entre os métodos eletroforético e espectrofotométrico. Segundo OZTEKIN et al (2002) as vantagens do método de eletroforese capilar para análise de nitratos e nitritos, usando capilares revestido, são tempo de análise curto, pouco consumo de reagentes e de amostras se comparado ao

método oficial de determinação de nitratos e nitritos por colorimetria.

4.2 Pesquisa de Mercado

O objetivo foi avaliar a tendência de qualidade deste produto disponível no mercado consumidor da região

metropolitana de Belo Horizonte. Foram realizadas análises em 12 amostras de embutidos de lingüiça tipo calabresa preparadas em triplicatas genuínas (total de 36 preparações), de diferentes marcas para

avaliar se a concentração de nitrito estavam de acordo com o limite preconizado, que é de 200 mg de nitrito/kg de produto cárneo pronto (BRASIL, 1997). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados da análise de nitrito em lingüiça tipo calabresa por meio de espectrofotometria (UV-Vis).

Amostra	Concentração de nitrito (mg/kg)
1	0,664
2	0,670
3	0,978
4	0,516
5	0,549
6	1,531
7	0,137
8	1,922
9	0,509
10	0,556
11	0,367
12	0,383

Os resultados das 12 amostras de lingüiça tipo calabresa, analisadas por espectrofotometria indicam que há uma grande variação entre os teores de nitrito utilizados na fabricação desses produtos. Apesar das diferenças encontradas para o teor de nitrito destas amostras, verifica-se que todas as amostras analisadas

encontraram-se dentro dos parâmetros exigidos pela legislação vigente.

4.3 Robustez

Todos os resultados da análise de robustez são apresentados no quadro 2.

Quadro 2 – Resultados da análise de robustez de lingüiça tipo calabresa analisada por eletroforese capilar

Ensaio	Área (mAU)	Altura (min)
	0,7	1,0
1	0,7	1,0
	0,8	1,1
Média	0,7	1,0
	0,8	1,3
2	0,7	1,3
	0,7	1,3
Média	0,7	1,3
	0,7	1,1
3	0,6	0,9
	0,7	1,0
Média	0,7	1,0
	0,8	1,4
4	0,8	1,3
	0,6	1,3
Média	0,7	1,3
	0,7	1,1
5	0,7	1,1
	0,7	1,0
Média	0,7	1,1
6	0,6	1,0

	0,6	1,0
	0,6	1,0
Média	0,6	1,0
	0,7	1,0
7	0,7	1,1
	0,7	1,0
Média	0,7	1,0
	0,6	1,0
8	0,6	1,0
	0,6	0,9
Média	0,6	1,0
	0,8	1,1
9	0,7	1,1
	0,8	1,1
Média	0,8	1,1
	0,5	1,1
10	0,5	0,9
	0,7	1,2
Média	0,6	1,1
	0,7	1,0
11	0,7	1,1
	0,7	1,0
Média	0,7	1,0
	0,6	1,4
12	0,9	1,5

	0,7	1,3
Média	0,7	1,4
	0,7	1,1
13	0,7	1,1
	0,7	1,1
Média	0,7	1,1
	0,6	1,1
14	0,6	1,1
	0,6	1,1
Média	0,6	1,1
	0,7	1,1
15	0,7	1,1
	0,7	1,1
Média	0,7	1,1
	0,6	1,1
16	0,7	1,2
	0,6	1,1
Média	0,6	1,1
	0,4	0,8
17	0,4	0,8
	0,4	0,8
Média	0,4	0,8
	0,7	1,1
18	0,7	1,1
	0,8	1,2

Média	0,7	1,1
	0,7	1,1
19	0,6	1,1
	0,7	1,2
Média	0,7	1,1

Os resultados apresentados mostram que não há variações significativas na área e altura da curva de nitrito no pico frente a pequenas variações nas condições de análise.

De acordo com o INMETRO (2003), a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Um método é considerado robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena em seus parâmetros. RIBANI et al (2004) ressaltam que em trabalhos nos quais há mudanças de fornecedores, marcas ou equipamentos ao longo do desenvolvimento e validação das metodologias, sem alteração significativa nos resultados, pode-se dizer que o método possui uma robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio a mudanças de ambiente de análise.

4.4 Comparação de resultados

Vários trabalhos foram desenvolvidos por meio de espectrofotometria utilizando a metodologia oficial (Brasil, 1999) para diferentes matrizes.

No trabalho realizado por REIS (2006) o método espectrofotométrico para determinação de nitrito usando como matriz o patê de presunto foi validado. As condições analíticas validadas foram SOUZA et al (1990), foi analisada a quantidade de nitrito e nitrato em produtos embutidos de carne e a maior diferença de concentração de nitrito ocorreu em lingüiças (381 ppm) e a menor em salames (114 ppm).

comprimento de onda de 540 nm e leitura das amostras entre 40 e 70 minutos após a adição dos reagentes complexantes. As características de desempenho obtidas foram: linearidade na faixa de trabalho estudada (0,125 a 3 µg de nitrito/mL), efeito de matriz não observado, sem interferência do ácido ascórbico e interferência do eritorbato de sódio nas concentrações acima de 2,5 mg/100g. O limite de detecção foi definido em 12,5 mg de nitrito/kg de patê e o limite de quantificação em 25 mg de nitrito/kg de patê. O método apresentou repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial nas condições testadas. A exatidão foi avaliada através dos valores de recuperação que variaram entre 84 e 110%. Na avaliação da robustez, as variações realizadas no procedimento de extração foram dependentes do nível de concentração existente na amostra.

Já OLIVEIRA et al (2005), utilizaram a metodologia publicada em BRASIL (1999) para quantificação de nitrato e nitrito em amostras de lingüiças de frango e de pernil tipo frescal, e observaram uma grande variação nos teores de nitrato e nitrito. Somente 7,1% das amostras analisadas estavam em desacordo com a legislação vigente. No trabalho apresentado por

MARSHALL e TRENERRY (1996) ressaltaram que a eletroforese capilar é um método rápido, simples e confiável para determinação de nitrato e nitrito em vários

tipos de alimentos. Eles determinaram nitratos e nitritos em queijos, repolho, sucos de frutas, água e produtos cárneos. O método é uma alternativa aos métodos cromatográficos.

SOARES (2007) propôs metodologia alternativa de análise para nitrito e nitrato por meio do uso da Eletroforese Capilar, ressaltando que é uma técnica de separação que oferece como vantagens: curto tempo de análise (menos de 3 minutos), pequeno volume de amostra necessária para injeção (menos de 1 mL) simplicidade do método, alta taxa de análise (5 amostras por hora, com % de recuperação inclusa) e ausência de pré-tratamento.

O presente trabalho comprovou as dificuldades de análise por espectrofotometria, em contraste com as vantagens oferecidas pela técnica de eletroforese capilar para análise de nitrato e nitrito. Observou-se também uma variação grande nas concentrações de nitrito em produtos cárneos.

4.5 Perfil da qualidade das amostras de produtos cárneos

Segundo OLIVEIRA et al, 2005, das 56 amostras de lingüiça de frango e pernil, analisadas para nitrato e nitrito pelo método espectrofotométrico, 7,1% das amostras estavam fora dos padrões exigidos pela legislação vigente.

Comparando os resultados deste trabalho com os apresentados na literatura, observamos que as indústrias estão atentas as recomendações dos órgãos governamentais quanto à utilização destes aditivos na fabricação de produtos embutidos de carne. Ressalta-se que produtos que apresentem limites de nitrito e nitrato acima dos permitidos pela legislação vigente oferecem riscos à saúde pública, demandando um controle cada vez mais

rigoroso por parte da indústria e dos órgãos oficiais.

5 CONCLUSÕES

O método de eletroforese capilar pode ser usado como um método alternativo à espectrofotometria para a análise de nitrito em lingüiça tipo calabresa, sendo um método bem mais fácil, rápido e robusto. Apresentando boa reprodutibilidade e acurácia.

A quantidade de nitrito encontrado em amostras de lingüiça tipo calabresa na região metropolitana de Belo Horizonte demonstrou o cumprimento dos limites estabelecidos legalmente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALESTEROS, M. R.; TAVARES, M. F. M.; RIBEIRO, S. J. L.; et al. Determination Observamos que as indústrias estão atentas as recomendações do órgãos.

BJEREGGAARD, C.; MOLLER, P.; SORENSEN, H. Determination of thiocyanate, iodide, nitrate and nitrite in biological samples by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography*, p. 409-414, 1995.

BORIES, P. N.; SCHERMAN, E.; DZIEDZIC L. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by capillary electrophoresis. *Clinical Chemistry*, v.32, n.1, p. 09-14, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova o regulamento técnico: Atribuições de função de aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8-carne e produtos cárneos. Portaria nº 1004 de 11 de dez. 1998. *Diário Oficial da União*, Brasília, 14 de dez. 1998. Disponível em: (www.anvisa.gov.br). Acesso em: 29 set. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de identidade e qualidade de linguiça. Instrução Normativa, nº 04 de 31 de mar. 2000. *Diário Oficial da União*. Brasília, 05 de abr. de 2000. Disponível em: (www.agricultura.gov.br). Acessado em: 10 ago. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Carnes, Produtos cárneos e seus ingredientes, Sal e Salmoura. Instrução Normativa, nº 20 de 9 de set. 1999. *Diário Oficial da União*. Brasília, 27 de jul. de 1999. Disponível em: (www.agricultura.gov.br). Acessado em: 29 set. 2009.

of olive oil acidity by CE. *Journal of Electrophoresis*. V.28, p. 3731-3736, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo decreto nº 30.691 de 29 de mar. 1952 e alterações. *Diário Oficial da União*. Brasília, 07 de jul. de 1952. Atualizado em 1997. Disponível em: (www.agricultura.gov.br). Acesso em: 05 out. 2009.

CERESER N. D.; COSTA F. M. R.; JUNIOR O. D. R.; et al; Botulismo de Origem Alimentar. *Ciência Rural*, v. 38, n.1, 2008.

Fluxo Eletrosmótico. Disponível em: http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elec_4/flue_2/flue_2.htm# Acesso em: 16 abr. 2010.

HARRIS, D. C. *Análise química quantitativa*. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 862p.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro. revisão 01: 2003. 36p.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro. revisão 02: 2007. 24p

IZCO J. M.; TORMO M.; HARRIS A.; et al; Optimization and Validation of a Rapid Method to Determine Citrate and Inorganic Phosphate in Milk by Capillary Electrophoresis. *Journal Dairy Science*, p.86-95, 2003.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por

- eletroforese capilar: Fundamentos e Aplicações. *Química Nova*; v.24, n.3, p.363-373, 2001.
- JONG, de N.; VISSER, S. & OLIEMAN, C. Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 652: 207-213, 1993.
- KILIC, B. Residual nitrite: a concern in cured meat products. *Meat processing*, v.39, p.40-41, 2000.
- LANDERS J. P. *Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, 3 ed. Nova York: CRC Press, 2008. 1598p.
- MARSHALL, P. A.; TRENERRY, V. C. The determination of nitrite e nitrate in foods by capillary ion electrophoresis. *Food Chemistry*, v.57, p.339-345, 1996.
- OEHRLE, S. A. Analysis of anions in drinking water by capillary ion electrophoresis. *Jornal of Chromatography*, p. 101-104, 1996.
- OLIVEIRA, M. A. L.; LAGO C. L.; TAVARES M. F. M.; Análise de ácidos graxos por eletroforese capilar utilizando detecção condutométrica sem contato. *Química Nova*, v. 26. n.6,p.821-824, 2003.
- OLIVEIRA, M. A. L.; *Análise de ácidos graxos por eletroforese capilar em óleos e gorduras*. 2003. 250f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Escola de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- OLIVEIRA, M. J.; ARAÚJO, W. M. C.; BORGIO, L. A.; Quantificação de nitrato e nitrito em lingüiças do tipo frescal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 4, 2005.
- OZTEKIN, N.; NUTKU, M. S.; ERIM, F. B. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, v. 76, p. 103-106, 2002.
- PARDI, M. C; SANTOS I. F; SOUZA E. R. et al. *Ciência, higiene e tecnologia da carne*. 2ª ed. Goiânia: UFG, 2001. v.2. 519p.
- PRINGUEZ, E.; SAUDE, I.; HULEN, C. Improvement of Standard Method IDF 95A:1984 for Determination of the Nitrate and Nitrite Contents of Dried Milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.8, p.344-350, 1995.
- RECIO I.; LÓPEZ-FANDINO. R.; OLANO, et al. Study of the formation of caseinomacropéptidos in stored ultra-high-temperature treated milk by capillary electrophoresis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.44 n.12 p.3845-3548, 1996.
- REIS, P. B. *Validação de método espectrofotométrico para determinação de nitrito em patê de presunto* – Belo Horizonte – Minas Gerais. 2006. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- RIBANI, M; BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C. H. et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- SANDERSON, J. E.; CONSAUL, J. R.; LEE, K. Nitrate Analysis in Meat; Comparison of two methods. *Journal of Food Science*, v. 56, n. 4, p.1123-1125, 1991.

SAH, R.N. Nitrate-nitrogen determination - a critical review. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.25, p.2841-2869, 1994.

SALOMEZ, J.; HOFMAN, G. Nitrate extraction from fresh plant material by means of a methanol:water extraction solution. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.33, p.3397-3404, 2002.

SOARES, D. C. *Aspectos Limnológicos do Córrego São Pedro* - Juiz De Fora – Minas Gerais. 2007. 220f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

SOUZA P. A.; FALEIROS R. R. S.;
SOUZA H. B. A. Dosagem de nitrito em produtos embutidos de carne. *Alim. Nitr.* p.27-34, 1990.

SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: Delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos* – Belo Horizonte – Minas Gerais. 2007. 297f. Dissertação (Doutorado em Farmácia) – Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Química Nova* v.20, n.5, p.493-511, 1997.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. *Química Nova* v.19, n.2, p.173-181, 1996.