

Fabiana Della Betta

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
RÁPIDOS POR ELETROFORESE CAPILAR APLICADOS À
ANÁLISE DE PRODUTOS CÁRNEOS E CERVEJA**

Tese de Doutorado submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Carolina de Oliveira Costa.

**FLORIANÓPOLIS
2017**

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 MÉTODOS RÁPIDOS
POR ELETROFORESE CAPILAR APLICADOS À ANÁLISE DE
PRODUTOS CÂRNEOS E CERVEJA / Fabiana Della Betta ;
orientadora, Ana Carolina de Oliveira Costa, 2017.
177 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Eletroforese
capilar. 3. Análise de alimentos. 4. Química verde.
5. Validação analítica. I. Costa, Ana Carolina de
Oliveira. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. III. Título.

Fabiana Della Betta

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
RÁPIDOS POR ELETROFORESE CAPILAR APLICADOS À
ANÁLISE DE PRODUTOS CÁRNEOS E CERVEJA**

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

Florianópolis, 18 de agosto de 2017.

Prof.^a Dr.^a Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

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

Prof.^a Dr.^a Renata Dias De Mello Castanho Amboni
Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC)

Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner
Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC)

Prof. Dr. André Wüst Zibetti
Universidade Federal de Santa Catarina (INE/UFSC)

Dr. Heitor Daguer
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)

Prof. Dr. Marccone Augusto Leal de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar a força necessária para superar as dificuldades e por sempre colocar pessoas especiais em meu caminho.

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

A minha orientadora Prof^a Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa pela oportunidade de realizar este trabalho, pela acolhida, pela confiança, paciência e dedicação. Pelos conselhos tanto na vida profissional quanto pessoal. Sou muito grata pela oportunidade de participar deste grupo de pesquisa.

A minha amiga Maria Laura pelos mais de 4 anos de amizade, companheirismo e por me lembrar que somos felizes.

Um agradecimento especial a Lais Morilla, Mariana Araújo Siqueira e Melissa Moliterno por toda ajuda e dedicação na execução dos experimentos e pela amizade construída ao longo desses vários anos.

A todos os colegas que passaram pelo Laboratório de Química de Alimentos ao longo destes mais de 5 anos de pós-graduação, foram muitas pessoas queridas e com toda a certeza aprendi muito com cada um de vocês. Agradeço também pela amizade que construímos diariamente, pelo companheirismo e pelas palavras de consolo quando necessário. Vocês tornaram fizeram meus dias mais felizes.

Ao nosso guru Luciano Gonzaga pelas inúmeras dicas e conselhos que levarei para a vida.

A prof^a Ana, a Mônia, ao prof^o Luciano Vitali por terem me ensinado muito sobre a eletroforese e terem muita paciência para ensinar quando eu, uma recém formada engenheira de alimentos, que nunca havia ouvido falar de eletroforese capilar iniciei minha aventura pela química analítica.

Aos meus amigos Cristian, Lucas, Japa e Raphael pela amizade e companheirismo nesses anos de Floripa, por todas as caronas, trilhas e barzinhos. Sou muito grata por tudo.

A todos os meus amigos e amigas em especial a Daniela Ogliari, Daiane da Silva, Aline Cenci, Fabiane Knak e Beatriz Sonai que mesmo de longe sempre estiveram torcendo muito por mim.

À Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

*“O melhor jeito de prever o destino é cria-lo”
(Abraham Lincoln)*

RESUMO

A eletroforese capilar se destaca por apresentar curtos tempos de separação, pela baixa geração de resíduos e baixos custos operacionais. Neste contexto, este estudo propôs o desenvolvimento de métodos simples, rápidos e que seguem os princípios da química verde, para determinação simultânea de nitrato e nitrito em amostras de produtos cárneos e bromato, brometo, nitrato e nitrito em amostras de cerveja utilizando eletroforese capilar de zona (CZE). Neste estudo foram contemplados aspectos relevantes sobre a racionalização no desenvolvimento de métodos por CZE, além de estratégias para diminuição do tempo total de análise e consequente aumento da frequência analítica em análise de alimentos. Visto que o preparo de amostras é considerado uma etapa limitante para o desenvolvimento de métodos rápidos e adequação à química verde, foram desenvolvidos preparos que minimizassem esses inconvenientes. Os métodos propostos foram validados segundo o protocolo da Eurachem e posteriormente aplicados à análise das amostras. Ambos os métodos foram classificados como adequados à química verde segundo a Eco-escala, uma vez que os pontos de penalização não foram superiores a 50. No método para determinação de nitrato e nitrito (pela extremidade mais próxima ao detector) os analitos foram separados em apenas 30 s, com tempo total de análise de 2,35 min, o que permitiu analisar aproximadamente 25 amostras/h. Das 13 amostras de produtos cárneos avaliadas, as concentrações do íon nitrato variaram de 58,2 a 173 mg kg⁻¹, para o íon nitrito as concentrações variaram de 8,4 a 127 mg kg⁻¹, enquanto que em relação ao nitrito residual uma amostra apresentou concentração acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira (150 mg kg⁻¹). Para a determinação de bromato, brometo, nitrato e nitrito foi utilizada a associação entre as estratégias de injeção dos analitos pela extremidade mais próxima ao detector e injeções múltiplas, o que resultou na separação de duas amostras em uma mesma corrida de apenas 26 s e tempo total de análise de 2,3 min, permitindo assim analisar cerca de 52 amostras/h. Nas 20 amostras de cerveja avaliadas as concentrações dos íons bromato, brometo e nitrito foram menores que o limite de detecção (0,75 mg L⁻¹ para bromato, 0,18 mg L⁻¹ para brometo e 0,15 mg L⁻¹ para nitrito) em todas as amostras, enquanto que o íon nitrato foi detectado em todas as amostras avaliadas, uma amostra apresentou concentração de nitrato menor que o limite de quantificação (0,30 mg L⁻¹), nas demais amostras as concentrações que variaram de 0,41 a 54,1 mg L⁻¹. Devido ao bom desempenho analítico, adequação à química verde, curtos tempos de

separação e alta frequência analítica, os métodos aqui propostos podem ser ferramentas úteis para a avaliação dos analitos objeto de estudo em amostras de produtos cárneos e cervejas, tanto em indústrias, como em laboratórios de análise de rotina e fiscalização.

Palavras-chave: Eletroforese capilar de zona. Métodos analíticos. Validação analítica. Química verde. Análise de alimentos.

ABSTRACT

Capillary electrophoresis is a technique that provides very fast separations, low generation of waste and low operational costs. In this regard, this study proposed the development of simple, fast and environmentally friendly method to determine simultaneously nitrate and nitrite in meat products and bromate, bromide, nitrate and nitrite in beer by capillary zone electrophoresis (CZE). Relevant information about the rational development of CZE methods and different approaches were assessed in order to decrease total analysis time and increase of throughput in food analysis. Since the sample preparation is considered a limiting factor on the development of fast methods and the method greenness, in this thesis sample preparing procedures were developed in order to minimize this drawbacks. The proposed methods were validated according to Eurachem protocol and after this procedure were applied for the analysis of the samples. Both methods were considered suitable for green chemistry according to the eco-scale, since the penalty points were below 50 points. In the method for nitrate and nitrite determination (using short-end injection – SEI-CZE) the analytes were separated in only 30 s, with total analysis time of 2.35 min which allows to analyses over 25 samples/h. Thirteen samples were assessed and the nitrate concentrations ranged from 58.2 to 173 mg kg⁻¹, nitrite concentrations ranged from 8.4 to 127 mg kg⁻¹, and one sample presented residual nitrite levels above the limit established by Brazilian legislation (150 mg kg⁻¹). For the bromate, bromide, nitrate and nitrite determination, the association of short-end injection and multiple injection resulted in the separation of two samples in a run of only 26 s, total analysis time of 2.3 min, allowing analyzing about 52 samples/h. Of those twenty beer samples assessed bromate, bromide and nitrite levels were in all samples under the LOD (0.75 mg L⁻¹ for bromate, 0.18 mg L⁻¹ for bromide and 0.15 mg L⁻¹ for nitrite), while nitrate was detected in all samples, one sample show nitrate concentration bellow the limit of quantification (0.30 mg L⁻¹), in the other samples concentrations ranged from 0.41 to 54.1 mg L⁻¹. Due the good analytical performance, the greenness, short time and the high throughput the proposed methods can be a useful tool to assess the quality of meat products and beer by industries, laboratories of routine analysis and surveillance.

Keywords: Capillary zone electrophoresis. Analytical methods. Analytical validation. Green chemistry. Food analysis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática de um sistema típico de eletroforese capilar	30
Figura 2 - Representação esquemática da separação de cátions e ânions utilizando DOI-CZE	33
Figura 3 - Representação esquemática do comprimento total e efetivo de um capilar de sílica fundida	35
Figura 4 - Representação esquemática do EOF	36
Figura 5 - Perfil de velocidade para (a) fluxo induzido por um campo elétrico e (b) fluxo induzido por pressão	37
Figura 6 - Curva de mobilidade do EOF em função do pH para um capilar de sílica fundida	37
Figura 7 - Representação esquemática dos modos de separação em CE (a) contra-eletrosmótico e (b) co-eletrosmótico na separação de um analito aniônico	38
Figura 8 - Representação da interface do <i>software PeakMaster®</i> versão 5.3, com separação da simulação da separação de nitrato, tiocianato e nitrito. Sendo (a) analitos e constituintes do eletrólito de corrida selecionados; (b) parâmetros instrumentais e tempo ou mobilidade do EOF; (c) aplicativo que permite a simulação da amplitude e formato das bandas eletroforéticas; (d) modo de detecção; (e) eletroferograma simulado; (f) parâmetros do sistema	40
Figura 9 - Representação esquemática da estratégia de injeções múltiplas de duas amostras	51
Figura 10 - Representação esquemática da estratégia de inversão de polaridade durante as corridas em CE. Br^- , brometo; NO_3^- , nitrato; I.S., padrão interno – Tiocianato; BrO_3^- , bromato; NO_2^- , nitrito	55
Figura 11 - Ilustração dos pictogramas de risco apresentado por reagentes químicos segundo a GHS	60
Figura 12 - Representação esquemática da reação de Griess.	79
Figura 13 - Representação esquemática do preparo de amostras para determinação de nitrato e nitrito	84
Figura 14 - Representação esquemática da avaliação do efeito de matriz utilizando o teste <i>t-Student</i>	87
Figura 15 - Amostra de salsichão tipo Lionês utilizada no ensaio de proficiência	91
Figura 16 - Eletroferogramas que ilustram o aumento da detectabilidade a partir das modificações do método original. (a) método otimizado; (b) método original proposto por Della Betta et al. (2014). Sendo: (1) nitrato, (I.S.) – tiocianato, (2) nitrito	93

Figura 17 - Eletroferograma da separação dos analitos em (a) solução padrão, (b) salame tipo italiano e (c) carne suína salgada, (d) mortadela. Onde: (1) nitrato, (I.S.) tiocianato, (2) nitrito. Condições de separação: capilar 48,5 cm (8,5 cm × 75 µm d.i. × 375 µm d.e.). BGE: 20 mmol L ⁻¹ de ácido perclórico e 65 mmol L ⁻¹ de β-alanina, pH 3,83, injeção hidrodinâmica (-50 mbar/ 4 s), -30 kV, polaridade negativa na injeção, detecção direta a 210 nm.....	95
Figura 18 – Estimativa do tempo de execução por amostra para determinação de (a) nitrato e nitrito por CZE (b) íon nitrato e (c) íon nitrito em produtos cárneos utilizando o método espectrométrico recomendado pelo o Mapa.....	97
Figura 19 - Estimativa do volume de resíduos gerados pelo método por CZE e dos métodos clássicos para determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos	98
Figura 20 – Adequação à química verde dos métodos por CZE e recomendados pelo Mapa segundo a Eco-escala	103
Figura 21 - Curva de calibração dos analitos em solução aquosa. (a) nitrato, (b) nitrito.....	106
Figura 22 - Eletroferograma experimental da seletividade. Onde: brometo (1), nitrato (2), tiocianato (3), nitrito (4), bromato (5), oxalato (6). Condições de separação: capilar de 48,5 cm (8,5 cm × 75 µm d.i. × 375 µm d.e.). BGE: 20 mmol L ⁻¹ de ácido perclórico e 65 mmol L ⁻¹ de β-alanina, pH 3,83, injeção hidrodinâmica (-50 mbar/ 4 s), -30 kV, polaridade negativa na extremidade da injeção, detecção direta a 210 nm	108
Figura 23 - Representação esquemática da formação de radícula em um grão de cevada submetido à germinação.....	124
Figura 24 - Representação esquemática do procedimento de preparo de amostras proposto	131
Figura 25 - Avaliação do parâmetro efeito de matriz.....	133
Figura 26 - Curva de mobilidade efetiva dos analitos versus pH. Sendo: (▼) Bromato, (■) Brometo, (○) I.S. – tiocianato, (●) Nitrato, (□) Nitrito,	137
Figura 27 – Definição dos parâmetros de separação analítica por meio de simulações no <i>software PeakMaster</i> ® fixando a concentração de β-alanina (40 mmol L ⁻¹) e variando a concentração de ácido perclórico (2,5-25 mmol L ⁻¹). (a) Parâmetros do BGE. (b) EMD <i>versus</i> concentração de ácido perclórico.....	139
Figura 28 - Eletroferograma da separação dos analitos. (a) simulação utilizando o <i>software PeakMaster</i> ® versão 5.3 e (b) em solução padrão. Legenda: (1) brometo; (2) nitrato; (3) bromato; (4) nitrito. Condições de	

separação: 10 mmol L ⁻¹ de ácido perclórico e 40 mmol L ⁻¹ de β-alanina, pH 3,96, injeção 50 mbar, 3 s, 30 kV, 32 cm (23,5 cm × 50 μm d.i. × 375 μm d.e.), detecção direta em 200 nm.....	140
Figura 29 - Eletroferogramas da separação dos analitos em solução padrão utilizando (a) SEI-CZE; (b) SEI-CZE com inversão da polaridade durante a separação; (c) SEI-MI; (d) SEI-MI com inversão da polaridade durante a separação. Sendo: (1) brometo, (2) nitrato; (I.S.) tiocianato, (3) bromato; (4) nitrito. Condições de separação: capilar 32 cm (8,5 cm × 50 μm d.i.). BGE: 10 mmol L ⁻¹ de ácido perclórico e 40 mmol L ⁻¹ de β-alanina, pH 3,96, -30 kV, detecção direta em 200 nm. Injeção hidrodinâmica.	142
Figura 30 - Eletroferograma da separação dos analitos utilizando SEI-MI. Em amostra (a) cerveja Ale 1 e cerveja Ale 2. (b) Padrões + amostra Lager. Sendo: (1) – brometo, (2) - nitrato; (I.S.) – Tiocianato, (3) - bromato; (4) – nitrito, (#) – desconhecido. Condições de separação: capilar 32 cm (8,5 cm × 50 μm d.i. × 375 μm d.e.). BGE: 10 mmol L ⁻¹ de ácido perclórico e 40 mmol L ⁻¹ de β-alanina, pH 3,96, -30 kV, detecção direta em 200 nm.....	145
Figura 31 - Tempo de execução por amostra do método por CZE proposto para determinação simultânea de bromato, brometo, nitrato e nitrito em amostras de cerveja	146
Figura 32 - Adequação à química verde do método por SEI-MI-CZE para determinação simultânea de bromato, brometo, nitrato e nitrito segundo a Eco-escala	148
Figura 33 - Curvas de calibração dos analitos em solução padrão dos íons bromato, e brometo	150
Figura 34 - Curvas de calibração dos analitos em solução padrão dos íons nitrato e nitrito.....	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos métodos analíticos segundo a Eco-escala	58
Tabela 2 - Parâmetros para determinação da Eco-escala	58
Tabela 3 - Consumo de energia por amostra apresentado por algumas técnicas analíticas e sua penalização segundo a Eco-escala.....	61
Tabela 4 - Compilação dos guias de validação analítica propostos por Eurachem e Inmetro	64
Tabela 5 - Parâmetros analíticos avaliados no teste de Youden, condições nominais e alteradas.	90
Tabela 6 - Delineamento experimental empregado no teste de Youden.	90
Tabela 7 - Eco-escala para o método por CZE para determinação simultânea de nitrato e nitrito por amostra	100
Tabela 8 - Eco-escala para o método clássico recomendado pelo Mapa para a determinação de nitrato por amostra.....	101
Tabela 9 - Eco-escala para o método clássico recomendado pelo Mapa para a determinação de nitrito	102
Tabela 10 - Resultados médios de recuperação aparente em amostras de produtos cárneos.....	109
Tabela 11 - Efeito da variação dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o íon nitrato.	111
Tabela 12 - Efeito da variação dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o íon nitrito.	111
Tabela 13 - Quantificação dos íons nitrato e nitrito em produtos cárneos.	113
Tabela 14 - Classificação e nacionalidade das amostras utilizadas no estudo	130
Tabela 15 - Delineamento experimental empregado no teste de Youden	135
Tabela 16 - Parâmetros analíticos avaliados no teste de Youden, condições nominais e alteradas	135
Tabela 17 - Dados de pK_a e mobilidade dos analitos objeto de estudo	137
Tabela 18 - Eco-escala do método por CZE para determinação simultânea de bromato, brometo, nitrato e nitrito.....	147
Tabela 19 – Resultados de repetibilidade e precisão intermediária obtida para os ânions bromato, brometo, nitrato e nitrito.....	152
Tabela 20 - Resultados de recuperação aparente em amostras de cerveja em diferentes níveis de fortificação.....	153

Tabela 21 - Resultados obtidos para os parâmetros LOD e LOQ para os ânions bromato, brometo, nitrato e nitrito.....	154
Tabela 22 - Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o íon bromato.....	155
Tabela 23 - Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o íon brometo.....	155
Tabela 24 - Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o íon nitrato.....	156
Tabela 25 - Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o íon nitrito.	156
Tabela 26 - Resultados para quantificação de bromato, brometo, nitrato e nitrito em cervejas nacionais e importadas	157

LISTA DE ABREVIATURAS

μ_{eff}	Mobilidade efetiva (do inglês, “effective mobility”)
μ_{eof}	Mobilidade eletrosmótica (do inglês, “electroosmotic mobility”)
μL	Microlitros
BGE	Eletrólito de corrida (do inglês, “background electrolyte”)
Área corrigida	Área do analito/Área do Padrão interno
Carrez I	Ferrocianeto de potássio
Carrez II	Acetato de zinco
CE	Eletroforese capilar (do inglês, “capillary electrophoresis”)
CMC	Concentração micelar crítica
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
d. e.	Diâmetro externo
DAD	Detector de arranjo de diodos
DC	Revestimentos dinâmicos (do inglês, “dynamic coating”)
DOI	Injeção por ambas as extremidades do capilar (do inglês, “Dual-opposite injection”)
EC	Comunidade Europeia (do inglês, “European Commission”)
EMD	Dispersão por eletromigração (do inglês, “electromigration dispersion”)
EOF	Fluxo eletrosmótico (do inglês, “electroosmotic flow”)
FIA	Análise por injeção em fluxo (do inglês, “flow injection analysis”)
HIBA	Ácido 2-hidroxi-isobutírico (do inglês, “2-hydroxyisobutyric acid”)
HEF	Campo elétrico elevado (do inglês, “high electric field”)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, “high performance liquid chromatography”)
I.S.	Padrão interno (do inglês, “internal standard”)
IAL	Instituto Adolfo Lutz

IARC	Agência internacional de pesquisa em câncer (do inglês, “International Agency for Research on Cancer”)
IDA	Ingestão diária aceitável
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	International Organization for Standardization
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
L_{eff}	Comprimento efetivo (do inglês, “effective length”)
L_{tot}	Comprimento total (do inglês, “total length”)
LOD	Limite de detecção (do inglês, “limit of detection”)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês, “limit of quantification”)
Mapa	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MI	Injeção múltipla (do inglês, “multiple injection”)
MMQG	Método dos mínimos quadrados generalizados
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
MMQP	Método dos mínimos quadrados ponderados
N	Número de pratos
NMKL	Comitê Nórdico de análise de alimentos (do inglês, “Nordic Committee on Food Analysis”).
Rs	Resolução
SEI	Injeção pela extremidade mais próxima ao detector (do inglês, “Short-end injection”)
SEI-HEF	Associação entre SEI e aplicação de campos elétricos elevados (do inglês, “short-end and high electric field”)
SEI-MI	Associação entre SEI e MI (do inglês, “short-end and multiple injection”)
SEI-DC	SEI em capilares com revestimento dinâmico (do inglês, “short-end and dynamic coating”)
SIE	Serviço de inspeção estadual
SIF	Serviço de inspeção federal
Tempo corrigido	Tempo de migração do analito/Tempo de migração do Padrão interno
TBS	Tetraborato de sódio decahidratado
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
U	Incerteza expandida
UV/Vis	Ultravioleta/ visível
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês, “World Health Organization”)

SUMÁRIO

CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	25
CAPITULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
1 ELETROFORESE CAPILAR	29
1.1 PRINCÍPIOS DE SEPARAÇÃO	29
1.2 INSTRUMENTAÇÃO	30
1.3 INTRODUÇÃO DA AMOSTRA	31
1.4 DETECÇÃO	33
1.5 CAPILAR	34
2 RACIONALIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS EM CZE	39
3 ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS EM CZE	47
3.1 UTILIZAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS ELEVADOS	47
3.2 SEI-CZE	48
3.3 INJEÇÕES MÚLTIPLAS	50
3.4 SEPARAÇÕES EM MODO CO-ELETROSMÓTICO E MODIFICAÇÕES NA SUPERFÍCIE INTERNA DO CAPILAR....	53
3.5 INVERSÃO DA POLARIDADE DURANTE AS CORRIDAS.....	54
3.6 ASSOCIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS	56
4 QUÍMICA VERDE	57
5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	63
CAPÍTULO 2 – MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM PRODUTOS CÁRNEOS UTILIZANDO SEI-CZE-UV: UMA ALTERNATIVA PARA ANÁLISE DE ROTINA.....	73
RESUMO	75
1 INTRODUÇÃO.....	77
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	83
2.1 REAGENTES E PADRÕES	83
2.2 INSTRUMENTAL	83
2.3 AMOSTRAS E PREPARO DE AMOSTRAS	84
2.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	85
2.4.1 Conformidade do sistema	85
2.4.2 Faixa de trabalho e linearidade	86
2.4.3 Efeito de matriz	86

2.4.4 Seletividade	88
2.4.5 Precisão	88
2.4.6 Exatidão.....	88
2.4.7 LOD e LOQ.....	89
2.4.8 Robustez	89
2.4.9 Incerteza de medição	90
2.4.10 Ensaio de proficiência	91
2.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO	92
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	92
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
3.1 MÉTODO POR CZE	93
3.2 PREPARO DE AMOSTRAS.....	94
3.3 ADEQUAÇÃO DO MÉTODO POR CZE E DOS MÉTODOS CLÁSSICOS AOS PRINCÍPIOS DA QUÍMICA VERDE	96
3.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	105
3.4.1 Conformidade do sistema	105
3.4.2 Linearidade.....	105
3.4.3 Efeito de matriz	107
3.4.4 Seletividade	107
3.4.5 Precisão	108
3.4.6 Exatidão.....	109
3.4.7 LOD e LOQ.....	109
3.4.8 Robustez	110
3.4.9 Incerteza de medição	112
3.4.10 Ensaio de proficiência	112
3.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO	113
4 CONCLUSÕES.....	115
CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO RÁPIDO POR CZE PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE BROMATO, BROMETO, NITRATO E NITRITO EM CERVEJAS.....	117
RESUMO.....	119
1 INTRODUÇÃO.....	121
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	129
2.1 REAGENTES	129
2.2 INSTRUMENTAL.....	129
2.3 AMOSTRAS E PREPARO DE AMOSTRAS.....	130
2.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	131
2.4.1 Conformidade do sistema	131
2.4.2 Faixa de trabalho e linearidade.....	132

2.4.3 Efeito de matriz	132
2.4.4 Seletividade	133
2.4.5 Precisão.....	134
2.4.6 Exatidão.....	134
2.4.7 LOD e LOQ.....	134
2.4.8 Robustez	134
2.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO	136
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	136
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	137
3.1 MÉTODO POR CZE.....	137
3.2 ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DO TEMPO TOTAL DE ANÁLISE	141
3.3 PREPARO DE AMOSTRAS	144
3.4 ADEQUAÇÃO DO MÉTODO AOS PRINCÍPIOS DA QUÍMICA VERDE.....	146
3.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	149
3.5.1 Conformidade do sistema	149
3.5.2 Linearidade	150
3.5.3 Efeito de matriz	151
3.5.4 Seletividade	152
3.4.7 LOD e LOQ.....	154
3.4.8 Robustez	154
3.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO	157
4 CONCLUSÕES	159
CONSIDERAÇÕES FINAIS	161
REFERÊNCIAS	163
ANEXO A – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....	177

CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

A análise de alimentos apresenta fundamental importância para o conhecimento da qualidade dos alimentos, padrões de identidade e qualidade e o cumprimento das legislações propostas pelos órgãos de fiscalização. Diversos métodos de análise já consolidados para aplicação em análise de produtos cárneos e cervejas estão disponíveis, dentre esses, aqueles recomendados por órgãos oficiais e os métodos normalizados¹. Estes métodos muitas vezes envolvem etapas com procedimentos demorados e laboriosos, com baixa sensibilidade, exatidão e precisão, que requerem elevada quantidade de materiais de laboratório e reagentes, na maioria das vezes reagentes conhecidamente tóxicos e/ou corrosivos, o que é um risco, tanto para o analista quanto para o meio ambiente, caso os resíduos não sejam devidamente tratados e descartados (MARWAHA, 2010).

Nas últimas décadas houve um aumento no interesse por métodos analíticos que empregam técnicas que resultam em menores impactos ambientais, que apresentam elevada sensibilidade e frequência analítica, alternativos aos métodos amplamente utilizados e recomendados por órgãos oficiais, aqueles considerados métodos clássicos. Dentre estas técnicas, a eletroforese capilar (CE, do inglês “capillary electrophoresis”) se destaca, pois, apresenta potencial para fornecer separações com elevada eficiência e rapidez, além de ser uma das técnicas que mais se adequa aos princípios da química verde, por utilizar majoritariamente solventes aquosos, quantidades reduzidas de amostra (injeções na ordem de nL) e produzir volumes igualmente reduzidos de resíduos (KALJURAND; KOEL, 2011).

Por apresentar um menor caminho óptico para detecção, a CE proporciona menor sensibilidade se comparado aos métodos cromatográficos, contudo, sua sensibilidade é adequada para diferentes aplicações, como o controle de processo para avaliar a presença de analitos ou avaliar quali e quantitativamente analitos presentes em amostras com níveis de concentração na ordem de mg kg⁻¹ ou mg L⁻¹ ou em níveis mais baixos de concentração quando empregados procedimentos de concentração *off line* e *in capillary*.

O preparo de amostras é, em muitas vezes, a etapa limitante para a obtenção de métodos rápidos, e por isso é de fundamental importância associar estudos de preparo de amostra ao desenvolvimento do método, a

¹ Métodos propostos por organizações técnicas como AOAC International, (International Organization for Standardization)

fim de minimizar o tempo global do procedimento de análise (KOEL; KALJURAND, 2006).

Dados analíticos confiáveis são requisitos para a interpretação correta de resultados e tomada de decisões. Desta forma, o desenvolvimento ou modificação de métodos analíticos sempre deve ser acompanhado de procedimentos de validação que assegurem a veracidade dos resultados obtidos (PETERS; DRUMMER; MUSSHOFF, 2007).

Neste contexto, é necessário que métodos rápidos e eficientes sejam desenvolvidos, adequadamente validados e aplicados, a fim de disponibilizar procedimentos analíticos mais simples para utilização em laboratórios de análise de alimentos e bebidas, nos quais a demanda por análises é crescente (KOEL; KALJURAND, 2006).

Esta tese está estruturada em 3 capítulos. No capítulo 1 é apresentada a revisão bibliográfica que abrange aspectos gerais sobre a técnica de CE, o desenvolvimento de métodos rápidos, validação analítica e química verde.

No capítulo 2 é apresentada a modificação de um método de separação utilizando CE para determinação simultânea de nitrato e nitrito em amostras de produtos cárneos. Contemplando também o estudo de validação do método proposto, o desenvolvimento de um procedimento de preparo de amostras simples e rápido e a avaliação da adequação do método aos princípios da química verde utilizando a Eco-escala. Sendo a utilização da Eco-escala inédita em estudos envolvendo métodos de eletroforese capilar. O método proposto neste capítulo vem sendo utilizado pelo Laboratório de produtos de origem animal/SLAV do Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA) para fins de fiscalização.

O capítulo 3 aborda o desenvolvimento e validação de um método rápido por CE para determinação simultânea de bromato, brometo, nitrato e nitrito em cervejas nacionais e importadas, utilizando diferentes estratégias para redução do tempo total de análise, aplicação inédita em análise de alimentos. Foi verificado também, a adequação do método aos princípios da química verde.

CAPITULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 ELETROFORESE CAPILAR

A CE se consolidou ao longo dos últimos anos como uma técnica analítica complementar em alguns aspectos, e até mesmo alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “High performance liquid chromatography”), por apresentar tempos de separação apreciavelmente curtos, menor custo operacional, possibilidade de simulação das separações e menores impactos ambientais (KALJURAND; KOEL, 2011; MAYER, 2001).

Os métodos de HPLC, apesar de reconhecidos por sua alta sensibilidade, apresentam algumas desvantagens quando comparados à CE, principalmente em relação ao maior custo de aquisição e operação (colunas, solventes de alto grau de pureza), ao elevado volume de solventes orgânicos utilizados, alguns deles com características tóxicas como o metanol e acetonitrila (KALJURAND; KOEL, 2011; KOEL; KALJURAND, 2006).

Existem vários modos de separação em CE, dentre os quais destacam-se:

- Eletroforese capilar de zona (CZE);
- Eletroforese capilar em gel (CGE);
- Focalização isoeletrica capilar (CIEF);
- Isotacoforese capilar (CITP);
- Eletrocromatografia Capilar (CEC, “capillary electrochromatography”);
- Cromatografia eletrocínética micelar (MEKC);

Dos modos de separação acima citados, a CZE é o mais utilizado para a determinação de cátions e ânions em diferentes matrizes, por isso suas particularidades e aplicações serão objeto de estudo neste trabalho.

1.1 PRINCÍPIOS DE SEPARAÇÃO

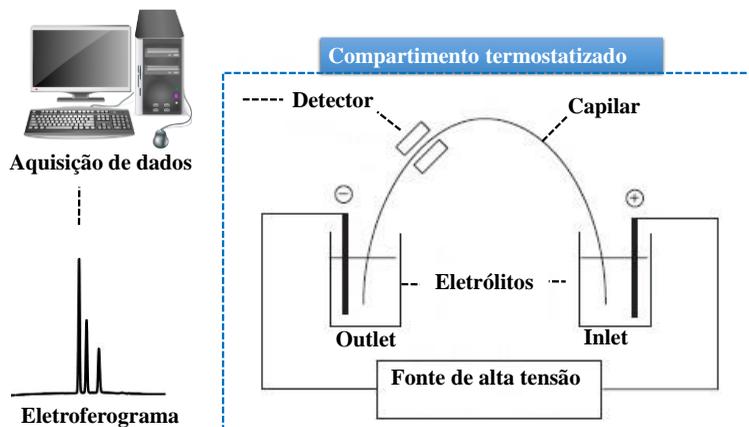
Para explicar o princípio de separação da CE, consideremos a introdução de uma solução contendo moléculas com cargas positivas, negativas e neutras no interior de um tubo capilar. Na ausência de um campo elétrico os íons desta solução se movimentam de forma aleatória. No entanto, quando uma diferença de potencial é aplicada os íons carregados presentes na solução migram ao longo do capilar com direção e velocidade determinadas por sua massa e carga. As espécies positivamente carregadas migram em direção ao eletrodo de carga negativa, as espécies negativamente carregadas migram em direção ao

eletrodo de carga positiva, enquanto que as espécies neutras migram na mesma velocidade que o fluxo eletrosmótico (discutido posteriormente no item 1.5 deste capítulo) na forma de uma única banda eletroforética.

1.2 INSTRUMENTAÇÃO

Os componentes básicos de um sistema de CE são: tubos capilares; uma fonte de alta tensão; eletrodos; um detector; sistema de refrigeração e um sistema para aquisição de dados (TAVARES, 1996), componentes ilustrados na Figura 1 e posteriormente discutidos ao longo deste capítulo.

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



Fonte: Adaptado de Buglass; Caven-Quantrill, 2011.

Em CZE, as separações são conduzidas em um tubo capilar preenchido com uma solução de eletrólito condutor (BGE), cuja função é entre outras coisas conduzir a corrente elétrica e promover a migração dos analitos. A amostra é introduzida no capilar por uma das extremidades por meio de um sistema de injeção. Em seguida, reservatórios contendo solução de BGE são posicionados em ambas as extremidades do capilar, e um campo elétrico é gerado, fazendo com que os componentes iônicos presentes na amostra migrem de acordo com suas próprias mobilidades, direção e velocidade alcançando o sistema de detecção. O sinal registrado no sistema de detecção é enviado para um computador, que por meio de um *software* específico fornece uma resposta gráfica do sinal em função do tempo, denominado eletroferograma (GARCÍA-RUIZ; MARINA, 2009; FISCHER; JANDERA, 2006; LANDERS, 2008).

Os equipamentos comerciais normalmente trabalham com tensão máxima de ± 30 kV (GARCÍA-RUIZ; MARINA, 2009). Apresentam também um sistema de injeção automatizado que facilita a realização de longas sequências de análise. Cada fabricante oferece um sistema próprio para aquisição e tratamento dos dados obtidos.

1.3 INTRODUÇÃO DA AMOSTRA

As amostras podem ser introduzidas no capilar por meio de injeção eletrocinética ou injeção hidrodinâmica. Na injeção eletrocinética, os reservatórios contendo eletrólito e amostra são posicionados nas extremidades do capilar e uma diferença de potencial de baixa magnitude é aplicada por alguns segundos. Quando a magnitude do fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês “electroosmotic flow”) for pouco significativa, os íons da amostra serão introduzidos no capilar, devido as suas próprias mobilidades eletroforéticas. Se a magnitude do EOF for alta, os íons presentes na amostra migrarão para o interior do capilar como resultado da combinação entre as velocidades eletroforética e eletrosmótica. Após a introdução de amostra os reservatórios de BGE são posicionados em ambas as extremidades do capilar e a separação pode ser iniciada após a aplicação de uma diferença de potencial (FISCHER; JANDERA, 2006; WHATLEY, 2001).

A injeção eletrocinética é menos utilizada, pois pode resultar em uma amostragem discriminativa e não representativa dos componentes da amostra, pois a quantidade introduzida será dependente da mobilidade dos analitos e do EOF (FISCHER; JANDERA, 2006; MAYER, 2001; WHATLEY, 2001). Consideremos por exemplo, a injeção de uma mistura constituída por compostos neutros e compostos iônicos com altos e baixos valores de mobilidade. A injeção dos íons com maior mobilidade será mais elevada em comparação a dos íons que apresentam menor mobilidade, enquanto que compostos neutros serão introduzidos no sistema exclusivamente pela ação do EOF.

Na injeção hidrodinâmica a amostra é introduzida no capilar pela aplicação de uma diferença de pressão entre os reservatórios de amostra e de BGE. A aplicação de pressão pode ser aplicada por diferentes métodos: pressurização, vácuo ou sifonagem (diferença de altura entre o reservatório de amostra e do BGE). Este modo de injeção resulta em uma amostragem representativa, além de apresentar maior repetibilidade quando comparada com a injeção eletrocinética, por isso é mais amplamente utilizada (FISCHER; JANDERA, 2006; SILVA et al., 2007; TAVARES, 1996).

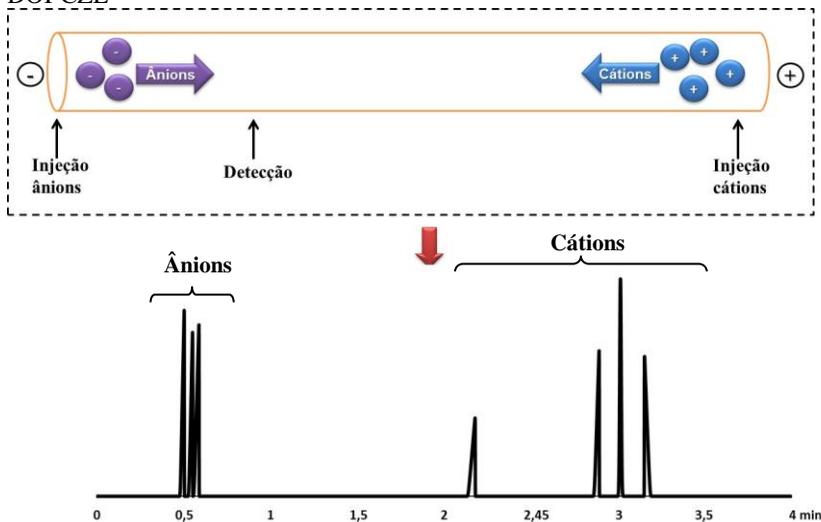
Independentemente do modo de injeção empregado (hidrodinâmico ou eletrocinético), as amostras podem ser introduzidas no capilar de três formas:

- Injeção convencional, pela extremidade do capilar mais afastada do detector;
- Injeção pela extremidade do capilar mais próxima ao detector (SEI, do inglês, “short-end injection”);
- Injeção por ambas as extremidades do capilar (DOI, do inglês, “dual-opposite injection”);

A DOI apresenta-se como uma ferramenta promissora para a determinação simultânea de cátions e ânions em CZE. Neste modo de injeção, a introdução dos analitos pode ser simultânea por meio de injeção eletrocinética, ou sequencial pela injeção eletrocinética ou hidrodinâmica dos analitos. Os cátions são introduzidos pela extremidade anódica e os ânions pela extremidade catódica, e quando gerado um campo elétrico migram em direção a seu eletrodo de carga oposta, e ao passarem pelo detector geram um sinal que é registrado pelo sistema de aquisição de dados (GAUDRY et al., 2013; LOPEZ et al., 2012).

As separações empregando DOI-CZE são conduzidas com EOF de baixa magnitude, de forma a permitir que os analitos migrem de acordo com suas próprias mobilidades (SÁIZ et al., 2014). A Figura 2 ilustra uma separação empregando DOI-CZE para a determinação simultânea dos ânions e cátions potássio, utilizando modo de detecção indireto (discutido posteriormente no item 1.4).

Figura 2 - Representação esquemática da separação de cátions e ânions utilizando DOI-CZE



Fonte: o próprio autor.

No exemplo, apresentado na Figura 2, os cátions foram introduzidos pela extremidade positiva, enquanto que os ânions foram introduzidos pela extremidade com polaridade negativa. Quando aplicada uma diferença de potencial, os cátions migram em direção ao polo de carga negativa, enquanto que os ânions migram em direção ao polo de carga positiva, passando pela janela de detecção, e resultando em um eletroferograma com bandas dos analitos.

1.4 DETECÇÃO

Diversos sistemas de detecção podem ser acoplados à CE, entre os quais se destacam os detectores de absorvância, condutividade, fluorescência, massas e índice de refração. Em geral a escolha do detector é dependente da aplicação, disponibilidade e da sensibilidade requerida (SWINNEY; BORNHOP, 2000).

Na literatura os detectores mais amplamente empregados são aqueles que utilizam a detecção da absorvância na região ultravioleta e/ou visível (UV/Vis) (VEUTHEY; GEISER; RUDAZ, 2005), no qual a detecção é realizada pela medida da absorção molecular da radiação eletromagnética pelos íons da amostra quando estes passam pelo detector.

Este tipo de detector fornece uma resposta seletiva, pois somente os componentes da amostra que absorvem radiação no comprimento de onda selecionado serão detectados.

Um importante aspecto da CE com detecção na região UV/Vis em relação a outras técnicas analíticas consiste na possibilidade de detecção de compostos que não possuem grupos cromóforos ou que possuem baixa absorvidade molar, sem derivatização por meio da detecção indireta. Nesse modo de detecção, um cromóforo iônico é adicionado ao BGE e devido à presença deste composto o detector recebe um sinal contínuo no comprimento de onda máximo deste cromóforo. Sendo assim, quando o analito, que com baixa absorvidade molar, passa pelo detector desloca os íons do cromóforo, de modo que o sinal de fundo diminui durante a passagem de sua banda eletroforética. Desta forma a detecção do analito é realizada indiretamente, pelo deslocamento do sinal a partir da diminuição da absorvância do composto cromóforo do BGE (BECKERS; BOČEK, 2003; LANDERS, 2008; SWINNEY; BORNHOP, 2000). Esta queda de absorvância é evidenciada no eletroferograma pela formação de bandas negativas em relação a linha de base. Contudo, essas bandas podem ser transformadas em um sinal positivo por meio da seleção de comprimento de onda de referência que será responsável pela inversão do sinal.

1.5 CAPILAR

Os tubos capilares, geralmente são constituídos por sílica fundida, material que confere baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica, alta transmitância óptica, resistência mecânica e química (TAVARES, 1996). Os tubos capilares comumente são revestidos externamente com poli-imida, material que lhe confere maleabilidade e facilita seu manuseio. Contudo uma fração deste revestimento à altura do detector deve ser removida, a fim de criar uma “janela” que permita a passagem de luz, e conseqüentemente a detecção do sinal analítico (WHATLEY, 2001).

As suas dimensões capilares (15 a 100 μm , diâmetro interno) minimizam os problemas relacionados à difusão e a dissipação do calor, o que associado à alta resistência elétrica do capilar permite a utilização de campos elétricos elevados, resultando em separações com elevada eficiência, resolução em curtos tempos de análise (TAVARES, 1996; WHATLEY, 2001).

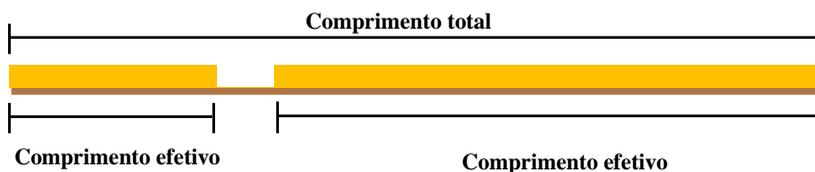
A passagem de corrente elétrica através de um tubo capilar preenchido com solução condutora resulta na geração de calor. Esse

aquecimento é conhecido como efeito Joule, e é inerente as separações eletroforéticas (WHATLEY, 2001). Contudo, pode ser minimizado por meio do adequado desenvolvimento do método que será discutido posteriormente no item 2 deste capítulo.

Nos equipamentos comerciais, o tubo capilar é disposto em um suporte conhecido como cartucho, que pode ser conectado a um compartimento termostatzado por meio da circulação de líquido ou ar forçado. A regulação térmica do capilar é um fator relevante e será discutida posteriormente ao longo deste capítulo.

O comprimento total de um capilar é determinado pela distância entre as suas extremidades. O comprimento efetivo é definido como a distância entre a extremidade de injeção e detecção (Figura 3). Ambas as dimensões podem variar de acordo com a marca e modelo do equipamento utilizado (FISCHER; JANDERA, 2006).

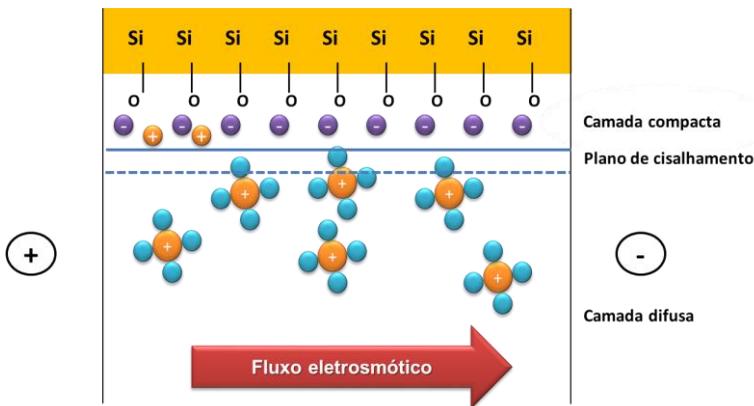
Figura 3 - Representação esquemática do comprimento total e efetivo de um capilar de sílica fundida



Fonte: o próprio autor.

O uso de capilares de sílica fundida é responsável por um fenômeno conhecido como EOF. A sílica fundida apresenta em sua composição grupamentos silanóis que apresentam caráter levemente ácido ($pka \sim 5,9$) e estes em contato com soluções de eletrólito ($pH > 2$) se ionizam tornando a parede negativamente carregada e a partir de sua dissociação, os íons H^+ migram para o seio da solução que preenche o capilar. Quando um campo elétrico é aplicado, esses íons positivamente carregados, solvatados por moléculas de água migram em direção ao eletrodo de carga oposta (cátodo), induzindo o movimento do fluxo de líquido dentro do capilar como um todo, o EOF, representado na Figura 4 (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997; TAVARES, 1997).

Figura 4 - Representação esquemática do EOF



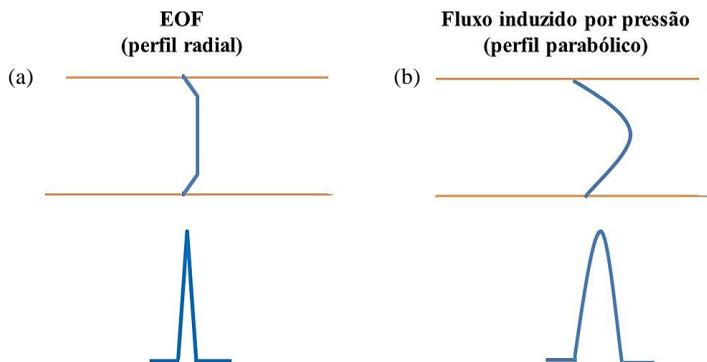
Fonte: o próprio autor.

Em condições normais o EOF migra em direção ao cátodo, e dessa forma migram primeiramente as espécies catiônicas, espécies neutras em uma única zona e posteriormente as espécies aniônicas (HARRIS, 2012).

A inversão do EOF pode ser realizada pela utilização de um surfactante catiônico ao BGE (por exemplo, CTAB, do inglês, “cetyl trimethylammonium bromide”). O surfactante que têm carga positiva, se liga ao silanoato (carregado negativamente) de modo a formar uma bicamada fortemente ligada à parede do capilar, invertendo assim a carga da parede e tornando-a positivamente carregada (hemi-micelas). Deste modo, quando uma diferença de potencial é aplicada e gerando um campo elétrico, os ânions do BGE criam um EOF do cátodo para o ânodo (HARRIS, 2012). Em condições de EOF invertido pela ação de um surfactante catiônico e polaridade invertida, a ordem de migração dos compostos também será invertida, desta forma migram os compostos aniônicos, neutros e catiônicos, respectivamente.

O EOF contribui para a alta eficiência da técnica, pois possui um perfil radial constante de velocidade que não contribui para o alargamento das bandas eletroforéticas, diferente do que acontece em outras técnicas de separação como a cromatografia em fase líquida que apresenta perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo induzido por pressão (WHATLEY, 2000), como mostra a Figura 5.

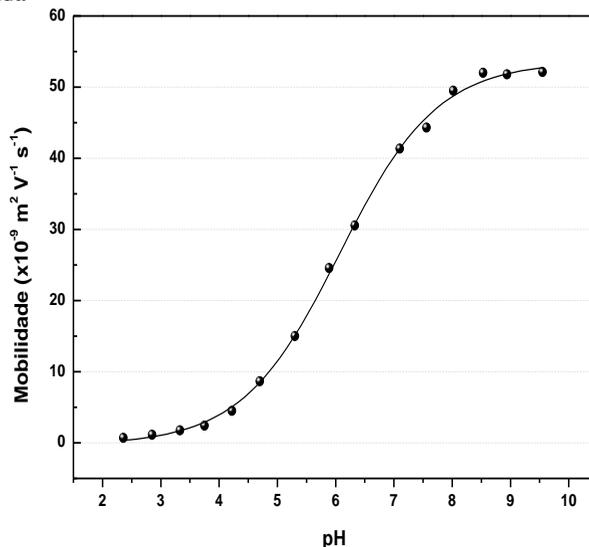
Figura 5 - Perfil de velocidade para (a) fluxo induzido por um campo elétrico e (b) fluxo induzido por pressão



Fonte: o próprio autor.

A magnitude do EOF é dependente do pH do BGE como é possível visualizar na Figura 6.

Figura 6 - Curva de mobilidade do EOF em função do pH para um capilar de sílica fundida

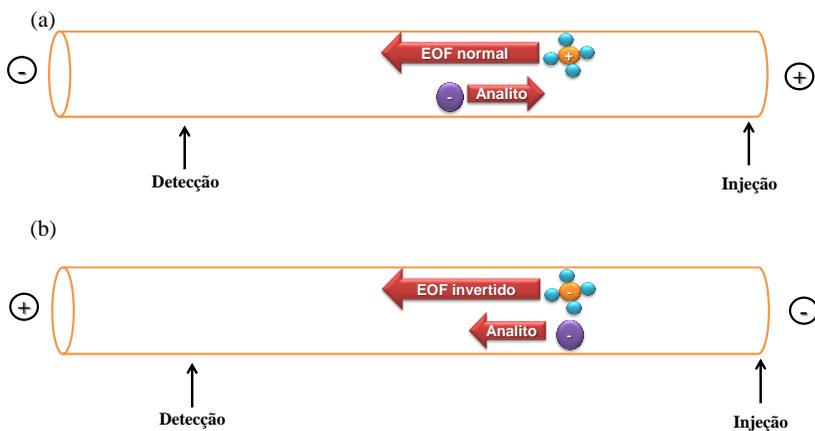


Fonte: Adaptado de FRAZIER; AMES; NURSTEN, 2000.

Em condições alcalinas a velocidade do fluxo é elevada e pode contribuir fortemente à separação, enquanto que em condições de pH menor que 4 a velocidade é muito próxima a zero, exercendo pouca influência na separação.

As separações em CZE podem ser conduzidas com ou sem a influência do EOF. Quando este está presente as separações podem ser conduzidas nos modos contra e co-eletrosmótico, cuja representação esquemática é ilustrada na Figura 7.

Figura 7 - Representação esquemática dos modos de separação em CE (a) contra-eletrosmótico e (b) co-eletrosmótico na separação de um analito aniônico.



Fonte: o próprio autor.

A mobilidade aparente é resultante da soma vetorial da mobilidade do analito (μ_{analito}) e da mobilidade do EOF (μ_{EOF}). No modo de separação contra-eletrosmótico, o analito e o EOF migram em direções opostas, contudo a mobilidade do EOF é maior que a mobilidade do analito, o que faz com que este seja conduzido pelo EOF até o detector. Enquanto que no modo de separação co-eletrosmótico, o analito e o EOF migram na mesma direção, conseqüentemente suas mobilidades vetoriais se somam e a separação acontece em menor tempo (COLOMBARA; TAVARES, MASSARO, 1997; WEINBERGER, 2005).

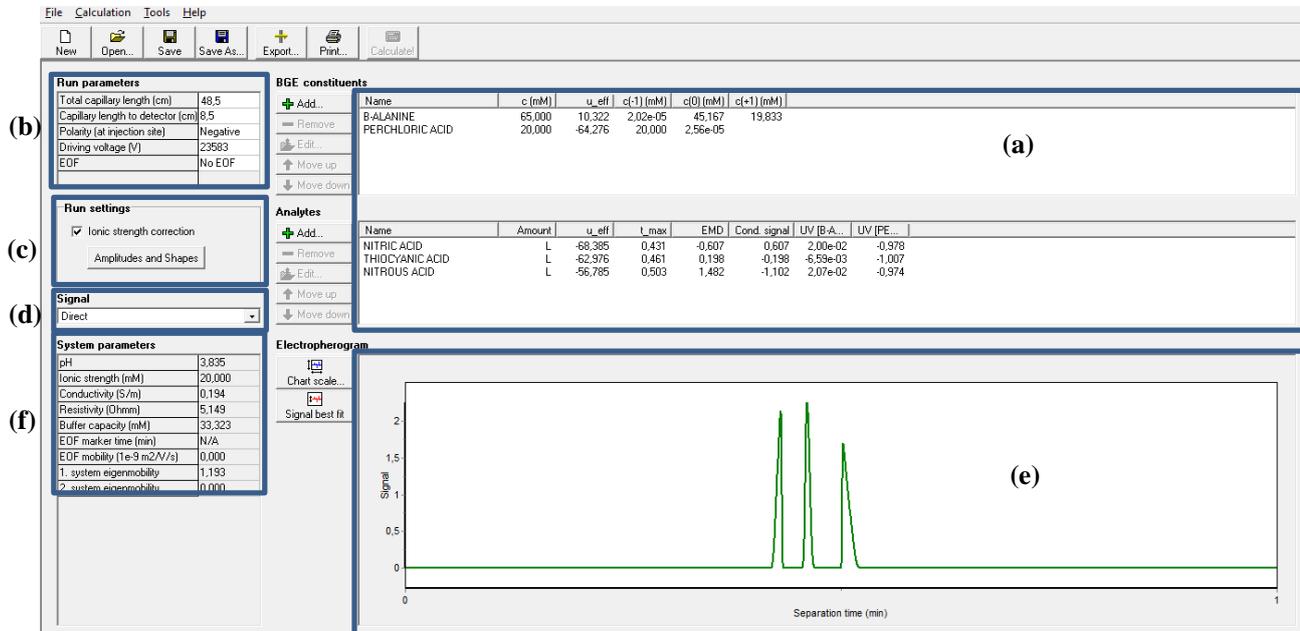
Em separações cuja introdução da amostra é conduzida por apenas uma extremidade do capilar, quando a velocidade do EOF é suficientemente alta, é possível realizar a determinação simultânea de compostos catiônicos, aniônicos e neutros, pois o fluxo conduz os solutos até o detector sem distinção de carga (JAGER; TAVARES, 2001).

2 RACIONALIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS EM CZE

O desenvolvimento de métodos de CZE muitas vezes pode ser um procedimento empírico, que se não realizado de forma adequada pode resultar em métodos não reprodutíveis, não robustos e com problemas de desempenho.

O *software PeakMaster*® desenvolvido por Gaš e colaboradores (GAŠ et al., 2005; JAROŠ et al., 2004) é uma ferramenta bem estabelecida no desenvolvimento de métodos por CE. Disponibilizado gratuitamente na internet (www.natur.cuni.cz/gas) permite simular a escolha dos componentes do BGE e outros parâmetros de separação, simulação de eletroferogramas, os quais na maioria das vezes demonstram grande similaridade aos obtidos experimentalmente, evitando assim o consumo de reagentes e geração de resíduos desnecessários, o que contribui de forma importante para a associação da técnica com a química verde. Dados de mobilidade eletroforética não disponíveis podem ser obtidos da literatura ou experimentalmente e inseridos no banco de dados do *software*. A interface do software é apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Representação da interface do *software PeakMaster®* versão 5.3, com separação da simulação da separação de nitrato, tiocianato e nitrito. Sendo (a) analitos e constituintes do eletrólito de corrida selecionados; (b) parâmetros instrumentais e tempo ou mobilidade do EOF; (c) aplicativo que permite a simulação da amplitude e formato das bandas eletroforéticas; (d) modo de detecção; (e) eletroferograma simulado; (f) parâmetros do sistema



Fonte: *software PeakMaster®* versão 5.3.

Diversos trabalhos disponíveis na literatura mostram a eficiência desta ferramenta no desenvolvimento de métodos rápidos por CE (DELLA BETTA et al., 2014; COSTA et al., 2007; COSTA et al., 2008).

Apesar de sua grande funcionalidade existem algumas situações que não podem ser simuladas, um exemplo disso são as separações por MEKC. Neste caso, o desenvolvimento do método deve ser obtido experimentalmente, o que pode ser empírico, laborioso e gerar resultados pouco robustos. Uma forma de contornar este problema e evitar decisões arbitrárias pode ser a aplicação de planejamento de experimentos.

Alguns autores têm proposto o desenvolvimento de métodos por CZE de uma forma racionalizada (COSTA et al., 2007; GONÇALVES FILHO; MICKE, 2007; SPUDEIT et al, 2016) e entre as principais etapas estão:

- 1 Conhecer as características estruturais dos analitos (carga, pK_a , presença de grupos cromóforos);
- 2 Construção da curva de pH *versus* mobilidade dos analitos;
- 3 Escolha da faixa de pH na qual os analitos estejam completamente ionizados;
- 4 Otimização do BGE: escolha do co-íon e contra-íon;
- 5 Escolha do padrão interno;
- 6 Seleção do modo de separação, co ou contra-eletrosmótico;
- 7 Definição dos demais parâmetros instrumentais: dimensões do capilar; tensão aplicada (kV); polaridade; modo de detecção;

- 8 Simulação da separação utilizando o *software PeakMaster®* para obtenção de parâmetros do sistema, parâmetros do BGE e eletroferograma;
- 9 Construção de gráficos dos componentes *versus* parâmetros do BGE obtidos em (8);
- 10 Escolha das concentrações ideais dos componentes do BGE;
- 11 Comparação dos eletroferogramas obtidos nas condições simuladas e experimentais.

Todo o desenvolvimento de método de CZE parte de um objetivo em comum, obter a separação de um analito ou grupo de analitos pertencentes a uma determinada amostra, portanto a primeira etapa consiste em conhecer as características estruturais e particularidades da (s) molécula (s) de estudo, por exemplo, qual a carga dos analitos (catiônica ou aniônica); por meio do pK_a determinar qual a faixa de pH em que o analito encontra-se completamente ionizado; e como será conduzida a detecção do mesmo (medida de absorvância direta ou indireta, fluorescência, condutividade).

A etapa (2) do desenvolvimento do método consiste na construção de curvas de pH *versus* mobilidade. Os dados de mobilidade podem ser obtidos em bancos de dados de *softwares* de simulação, modelagem matemática, literatura científica ou ainda ser determinada experimentalmente.

A partir da curva de mobilidade *versus* pH obtida em (2) é possível eleger a faixa de pH na qual os analitos estão totalmente ionizados e apresentam diferenças de mobilidade suficiente para permitir sua separação com resolução adequada (3).

Em (4) se inicia a otimização do BGE, por meio da escolha do co-íon e do contra-íon. O co-íon é o componente do BGE que apresenta a mesma carga do analito, enquanto que o contra-íon apresenta carga oposta ao analito. O co-íon escolhido deve ser compatível com o modo de detecção empregado, estar totalmente ionizado na faixa de pH previamente definida, apresentar mobilidade efetiva (μ_{eff}) similar ao analito, ou quando se tratar de vários analitos, deve ser similar a média das mobilidades dos mesmos. A escolha do co-íon adequado reduz os

efeitos de dispersão por eletromigração (EMD, do inglês, “electromigration dispersion”), resultando em bandas eletroforéticas simétricas e eficientes (BECKERS, J. L.; BOČEK, 2003). Caso o co-íon não apresente capacidade tamponante no pH de separação, deve-se escolher um contra-íon que desempenhe esta função indispensável, prevenindo a eletrólise e garantindo a estabilidade do BGE ao longo de longas sequências de análise. O contra-íon escolhido deve ainda ser compatível com o sistema de detecção utilizado.

A utilização de padrão interno (I.S., do inglês “internal standard”) em métodos de CE é altamente recomendável para corrigir possíveis erros de injeção associados aos pequenos volumes introduzidos no capilar. Em (5) faz-se a escolha do I.S., o qual deve estar completamente ionizado no pH escolhido, apresentar mobilidade efetiva similar à do co-íon e dos analitos, ser compatível com o modo de detecção, e não estar presente nas amostras estudadas em concentrações detectáveis;

Dependendo do pK_a , carga dos analitos e do pH de separação escolhido, determina-se em (6) se a separação será conduzida em modo co ou contra-eletrosmótico. Os valores de EOF podem ser obtidos na literatura ou experimentalmente, e adicionados à simulação no *software PeakMaster*®. Não é necessário conhecer o valor exato da mobilidade, uma vez que o principal objetivo é obter uma estimativa da separação.

Em (7) são definidos os demais parâmetros instrumentais, entre eles as dimensões do capilar (comprimento total, comprimento efetivo e diâmetro interno); tensão aplicada; polaridade; e tempo de injeção. A escolha destes parâmetros é importante, pois pode influenciar tanto na velocidade, sensibilidade quanto na precisão das separações.

O uso de tensões elevadas resulta em um aumento na taxa de migração do EOF e dos analitos. Contudo, um fator limitante da aplicação de tensões elevadas é a excessiva geração de calor no interior do capilar, que pode ocasionar mudanças na viscosidade das soluções, e consequentemente na mobilidade e difusão dos analitos, resultando em alargamento das bandas eletroforéticas e redução na eficiência da separação (GEIGER; HOGERTON; BOWSER, 2012). É aconselhável manter valores de corrente elétrica abaixo de 100 μA , pois o uso de correntes elevadas além de gerar calor no interior do capilar também acelera a depleção do BGE, limitando seu número de corridas e requerendo trocas frequentes durante longas sequências de análise (WEINBERGER, 2005).

Além da tensão, as dimensões do capilar também podem implicar em problemas de dissipação do calor. Apesar de melhorar a detectabilidade pelo aumento do caminho óptico, o aumento do diâmetro

interno resulta na elevação da corrente elétrica ao longo do capilar. Entretanto, este problema pode ser contornado pelo aumento no comprimento total do capilar.

A precisão normalmente é avaliada em CE por meio dos parâmetros tempo de migração e área das bandas eletroforéticas, e estes por sua vez podem ser influenciados por diversos fatores entre os quais se destacam: injeção; difusão; mobilidade do analito; magnitude do EOF; interações com a superfície interna do capilar; temperatura (MAYER, 2001). Por isso a adequada otimização do BGE, dos parâmetros de separação e a utilização de I.S. são imprescindíveis para obtenção de métodos analíticos reproduzíveis.

Na etapa (8) pela utilização do *software PeakMaster®*, são realizadas simulações da separação dos analitos na faixa de pH previamente escolhida em (3). Por meio das simulações são obtidos eletroferogramas e dados relacionados aos parâmetros do sistema e do BGE (tempo de migração, capacidade tamponante, condutividade, força iônica, EMD).

A partir das informações obtidas em (8), são construídos em (9) os gráficos dos componentes do BGE *versus* parâmetros de separação, com base nos quais são escolhidas as concentrações ideais dos componentes do BGE (10). Por fim, em (11) realiza-se a comparação dos eletroferogramas obtidos nas condições simuladas e experimentais para verificação da similaridade entre os mesmos.

A escolha do BGE adequado e o controle do pH são aspectos imprescindíveis para o apropriado funcionamento do método desenvolvido. Além dos aspectos já discutidos acima, um BGE considerado adequado deve:

- Ser estável ao longo de sua utilização e não sofrer depleção facilmente;
- Apresentar boa capacidade tamponante, por isso valores superiores a 10 mmol L⁻¹ são recomendados;
- Apresentar baixa condutividade elétrica e força iônica (< 20 mmol L⁻¹), para minimizar a geração de calor no interior do capilar;
- Apresentar baixa EMD (< 5), para minimizar a assimetria das bandas;

Além dos aspectos previamente discutidos sobre desenvolvimento de métodos por CE, outro parâmetro importante e muitas vezes negligenciado é o condicionamento do capilar. Parâmetro o qual, está diretamente relacionado a obtenção de dados reproduzíveis, pois garante

a estabilização da superfície interna do capilar, gerando menores variações nos tempos de migração dos analitos e do EOF (MAYER, 2001). É recomendável realizar o condicionamento do capilar antes do primeiro uso, no início e no fim de cada dia de trabalho.

O condicionamento pode ser realizado pela lavagem do capilar utilizando NaOH, água e BGE, ou mesmo pela aplicação de tensão elétrica. A lavagem entre corridas também é recomendada para evitar a adsorção de analitos e re-equilibrar a superfície interna do capilar para a próxima corrida (MAYER, 2001).

3 ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS EM CZE

A CE já é uma técnica conhecida pelos reduzidos tempos de separação, contudo a crescente demanda por métodos de análise cada vez mais rápidos levou ao uso de estratégias que buscam reduzir mais ainda os tempos de análises.

O tempo total de análise em CE compreende o tempo necessário para: (i) o posicionamento dos reservatórios de lavagem do capilar; (ii) lavagem do capilar antes da corrida eletroforética; (iii) troca do reservatório de lavagem pelo reservatório da amostra; (iv) injeção da amostra; (v) troca do reservatório da amostra pelo de lavagem; (vi) corrida propriamente dita. Desta forma, a eliminação ou redução do tempo de alguma dessas etapas influenciará de forma positiva para o aumento da frequência analítica do método.

As principais estratégias para obtenção de separações rápidas em CE incluem: (a) utilização de campos elétricos elevados; (b) redução do comprimento efetivo do capilar por meio de SEI (injeção pela proximidade mais próxima ao detector); (c) aplicação de injeções múltiplas em uma mesma corrida; (d) separações em modo co-eletrosmótico e modificação da superfície interna do capilar; (e) inversão da polaridade durante as corridas; (f) associação de estratégias para obtenção de métodos rápidos. A utilização destas estratégias será discutida a seguir, sempre que possível por meio de exemplos de suas aplicações em análise de alimentos.

3.1 UTILIZAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS ELEVADOS

Sabe-se que a velocidade de migração de um composto iônico é proporcional a intensidade do campo elétrico aplicado. Por isso a utilização de campos elétricos elevados (HEF, do inglês, “high electric field”) é uma estratégia utilizada para a obtenção de métodos rápidos por CE (GEISER; RUDAZ; VEUTHEY, 2005).

A intensidade de um campo elétrico é dada pela relação entre a tensão aplicada (V) e comprimento (L) da seção onde o campo é aplicado (LANDERS, 2008). Assim, separações mais rápidas podem ser obtidas pelo uso de tensões elevadas e redução do tamanho do capilar. Contudo como previamente discutido, a utilização de tensões elevadas pode resultar em alargamento das bandas eletroforéticas por problemas relacionados a dissipação de calor, aspectos que podem ser previstos e minimizados pela seleção adequada dos constituintes do BGE.

Um exemplo de aplicação desta estratégia é proposto para a determinação de lidocaína e procaína em fármacos por Geiser, Rudaz e Veuthey (2005). Os autores promoveram um aumento do campo elétrico de 619 para 923 V/cm pela redução do comprimento total (L_{tot}) de 48,5 para 32,5 e efetivo (L_{eff}) de 40 para 24 cm. A partir dessa modificação o tempo de separação foi modificado significativamente diminuindo de 4,6 para 1,3 min.

3.2 SEI-CZE

Outra estratégia para obtenção de métodos rápidos consiste na introdução da amostra pela extremidade mais próxima ao detector, SEI (previamente ilustrado na Figura 3). O comprimento efetivo mínimo de um capilar varia de acordo com o equipamento, apresentando geralmente de 7 a 10 cm.

Quando comparado à injeção convencional, as separações são mais rápidas pela redução da distância percorrida pelos analitos até o sistema de detecção. O menor tempo de corrida, minimiza os processos de difusão no interior do capilar, resultando em bandas com maior simetria e eficiência; além de reduzir a depleção do BGE e minimizar a adsorção de proteínas aumentando a reprodutibilidade (GARCÍA; CHUMBIMUNITORRES; CARRILHO, 2013).

Em geral, a utilização de SEI é simples e não requer grandes modificações em relação à injeção convencional, sendo possível utilizar o mesmo capilar e demais características do método de separação, alterando apenas parâmetros relacionados a injeção e a polaridade. Quando utilizada injeção hidrodinâmica, a mesma é conduzida posicionando o reservatório de amostra ou solução padrão a ser injetada na extremidade mais próxima ao detector, o reservatório de BGE é posicionado na outra extremidade e então pressão negativa é aplicada por alguns segundos, fazendo com a amostra seja introduzida no capilar. A mesma configuração dos reservatórios é utilizada para a injeção eletrocinética, porém com aplicação de tensão na polaridade adequada (ALTRIA; KELLY; CLARK, 1996; GLATZ, 2013).

A seleção da polaridade utilizada em SEI depende da carga dos analitos a serem determinados, visto que geralmente o analito migrará em direção ao polo de carga oposta à sua. Portanto quando da determinação de cátions, a polaridade deve ser invertida, fazendo com que o eletrodo posicionado na extremidade mais afastada do detector apresente polaridade negativa ou do contrário não haverá migração dos analitos no capilar. Enquanto que em uma separação de ânions por SEI, a alteração

da polaridade não é requerida, uma vez que os analitos migrarão em direção ao eletrodo da extremidade mais afastada do detector que já apresenta carga oposta.

Dentre as estratégias de redução de tempo, a utilização de SEI é uma das mais amplamente utilizadas, tanto individualmente como em associação com outras estratégias para análise de alimentos, bebidas e fármacos. Devido ao seu menor L_{eff} , a SEI é recomendável para utilização em métodos cujo objetivo seja analisar um número pequeno de analitos, que apresentam um grau de seletividade e resolução mínimas para evitar sua co-migração.

Costa e colaboradores (2008) desenvolveram um método por SEI-CZE para determinar sorbato e benzoato em bebidas não alcoólicas. As separações foram conduzidas em um capilar de 32 cm ($L_{\text{eff}} = 8,5$ cm, d. i. $50 \mu\text{m}$), o BGE foi composto por 25 mmol L^{-1} de TRIS, $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de HIBA, pH 8,1. Amostras e padrões foram introduzidos no capilar por meio de injeção hidrodinâmica ($-50 \text{ mbar}/3\text{s}$), tensão de 30 kV, polaridade positiva na injeção e modo de detecção direta. Salicilato foi utilizado como I.S. A utilização de SEI permitiu a separação dos analitos com resolução satisfatória em apenas 28 s.

Della Betta e colaboradores (2014) desenvolveram um método por SEI-CZE para determinar nitrato e nitrito em alimentos infantis. As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida de 32 cm ($L_{\text{eff}} = 8,5$ cm, d. i. $50 \mu\text{m}$), o BGE foi composto por 10 mmol L^{-1} de ácido perclórico e 40 mmol L^{-1} de β -alanina, pH 3,96. Amostras e padrões foram introduzidos no capilar por meio de injeção hidrodinâmica ($-50 \text{ mbar}/3\text{s}$), tensão de 30 kV, polaridade negativa na injeção e modo de detecção direta a 210 nm. Como I.S, tiocianato foi utilizado. A utilização de SEI permitiu a separação dos analitos com resolução satisfatória em apenas 30 s.

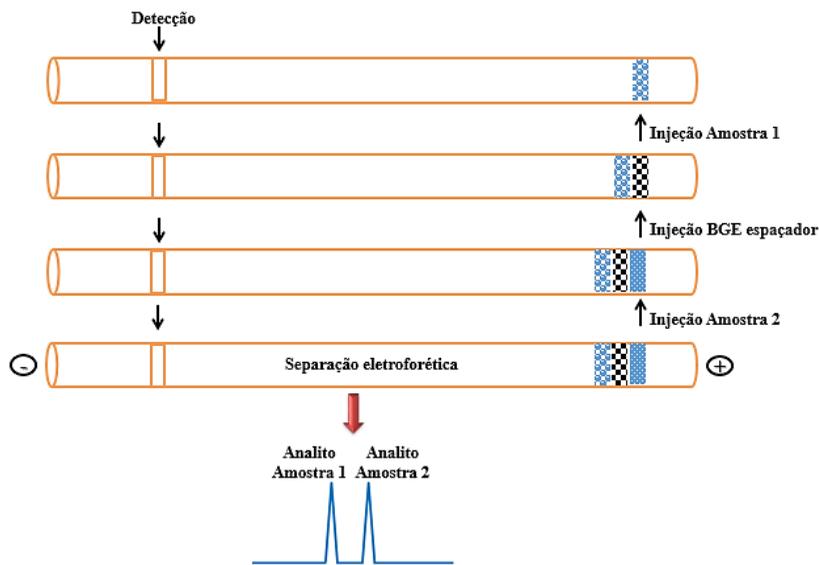
Para determinar aspartame, ciclamato, acessulfame-K e sacarina em alimentos e fármacos, Vistuba et al. (2015) desenvolveram um método por SEI-CZE. As separações foram conduzidas em um capilar de 48,5 cm ($L_{\text{eff}} = 8,5$ cm, d. i. $50 \mu\text{m}$), o BGE foi composto por 45 mmol L^{-1} TRIS, 15 mmol L^{-1} ácido benzoico, pH 8,4. Amostras e padrões foram introduzidos sob injeção hidrodinâmica ($50 \text{ mbar}/3 \text{ s}$), aplicado tensão de separação de 30 kV, polaridade negativa na extremidade da injeção e detecção direta. A utilização desta estratégia resultou na separação dos quatro analitos em apenas 53 s.

3.3 INJEÇÕES MÚLTIPLAS

Outra valiosa estratégia para a obtenção de métodos rápidos em CE consiste na aplicação de injeções múltiplas (MI, do inglês “multiple-injection”). Por meio desta estratégia é possível analisar diferentes amostras simultaneamente em uma única corrida, o que resulta em uma expressiva redução do tempo total de análise pela eliminação de etapas de lavagem entre as corridas (AMINI et al., 2008; GEISER; RUDAZ; VEUTHEY, 2003).

As amostras podem ser introduzidas por injeção convencional ou por SEI, dependendo da quantidade de analitos e da complexidade da amostra. O comprimento do capilar também pode ser aumentado dependendo do objetivo proposto pelo estudo. As amostras são introduzidas no capilar sequencialmente, intercaladas com seguimentos de BGE que atuam como espaçadores. Assim, quando aplicada uma diferença de potencial e gerado um campo elétrico, as diferentes bandas eletroforéticas migram de acordo com suas próprias mobilidades em zonas distintas alcançando o sistema de detecção, resultando em um único eletroferograma onde é possível visualizar os mesmos analitos repetidamente em bandas eletroforéticas distintas. A Figura 9 ilustra a estratégia de injeções múltiplas.

Figura 9 - Representação esquemática da estratégia de injeções múltiplas de duas amostras



Fonte: o próprio autor.

Um dos pré-requisitos para a execução de injeções múltiplas é a ausência de interferentes na região de separação dos analitos (AMINI et al., 2008), desta forma recomenda-se a realização de testes preliminares de injeção da amostra para garantir a adequação desta para as posteriores injeções sequenciais. Além de maior ênfase na etapa de preparo de amostras para minimizar a presença destas substâncias interferentes, que possam prejudicar a seletividade do método. Outro aspecto a ser considerado é a utilização de I.S., pois por meio de sua utilização se minimiza as oscilações inerentes a introdução da amostra.

Em geral, a estratégia de MI resulta em expressivo aumento na frequência analítica em comparação aos métodos de injeção única. A utilização de MI aumenta também a precisão e exatidão do método, pela minimização de variações nos parâmetros tempo de migração e área da banda eletroforética, causados principalmente por pequenas oscilações nos parâmetros de separação entre as corridas (AMINI et al., 2008; LÓDEN et al., 2008), torna mais fácil a aquisição dos dados pela obtenção de mais de uma amostra em um mesmo eletroferograma. Além de fornecer um grau de aleatoriedade único nas separações, pela

possibilidade de determinar soluções padrões e amostras simultaneamente.

Até o presente momento, não há relatos na literatura da aplicação da MI em métodos por CZE aplicados a análise de alimentos, sua principal área de aplicação tem sido na análise de fármacos. Um exemplo disso é o trabalho proposto por Vitali e colaboradores (2011) que utilizou MI-CZE associada a SEI para determinar iodeto em fármacos. As separações foram conduzidas em um capilar de dimensões 32 cm (L_{eff} 8,5 cm x 50 μ m d. i.) modificado com sal de quitosana quaternizada para inversão do EOF. O BGE foi composto por 20 mmol L⁻¹ TRIS, 11 mmol L⁻¹ ácido clorídrico, pH 8. As amostras e padrões foram introduzidas no capilar por meio de injeção hidrodinâmica na seguinte ordem:

- Amostra 1: -50 mbar/ 3 s;
- BGE espaçador: -50 mbar/ 7 s;
- Amostra 2: -50 mbar/ 3 s;
- BGE espaçador: -50 mbar / 8 s;
- Amostra 3: - 50 mbar/ 3 s;

Aplicando tensão de 30 kV, com polaridade negativa na extremidade da injeção e modo de detecção direta a 220 nm. Tiocianato foi utilizado como I.S. O método proposto pelos autores permitiu determinação simultânea de quatro amostras em apenas 10 s de separação, apresentando frequência analítica de cerca de 80 amostras por hora.

Vitali, Fávere e Micke (2011) desenvolveram um método de MI-CZE para a determinação de nitrato e tiocianato em saliva de humana. As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida L_{tot} 48,5 cm (L_{eff} 8,5 cm x 75 μ m d. i.). Para inversão do EOF o capilar foi modificado com sal de quitosana quaternizada. O BGE foi composto por 12 mmol L⁻¹ TRIS, 8,5 mmol L⁻¹ ácido sulfúrico, pH 2,5. Amostras e padrões foram injetados hidrodinamicamente na seguinte ordem:

- Amostra 1: -40 mbar/ 4 s;
- BGE espaçador: -40 mbar/3 s;
- Amostra 2: -40 mbar/ 4 s;
- BGE espaçador: -40 mbar / 3 s;

Após a injeção foi aplicada tensão de 25 kV, com polaridade negativa na extremidade da injeção e detecção direta a 200 nm. A partir do método proposto foi possível analisar duas amostras em 20 s, o que resultou em uma frequência analítica de 21 amostras por hora.

3.4 SEPARAÇÕES EM MODO CO-ELETROSMÓTICO E MODIFICAÇÕES NA SUPERFÍCIE INTERNA DO CAPILAR

O EOF tem grande influência nas separações por CE podendo alterar a velocidade da separação, tempos de migração dos analitos, além da eficiência e resolução das bandas eletroforéticas (LANDERS, 2008). Desta forma, a possibilidade de realização das separações em modo co-eletrosmótico pode ser uma estratégia para a obtenção de métodos rápidos. Como previamente discutido, neste modo de separação os analitos migram no mesmo sentido do EOF, somando suas velocidades, resultando em menores tempos de separação.

O sentido de migração do EOF pode ser invertido pela modificação da superfície interna do capilar por surfactantes catiônicos ou pelo uso de revestimentos não covalentes. Quando a superfície interna de um capilar é tratada com um aditivo catiônico, este é adsorvido pelos grupamentos silanois por meio de interação eletrostática, resultando em um revestimento dinâmico (BUGLASS; CAVEN-QUANTRILL, 2011). De maneira semelhante os revestimentos não covalentes permitem a inversão do EOF, diminuem a adsorção de proteínas pela minimização dessa interação com a superfície interna do capilar.

Apesar das vantagens acima mencionadas, a modificação da superfície interna pela utilização de revestimentos, podem resultar em oscilações nos tempos de migração por influência de variações no EOF, além de poder apresentar degradação ao longo de longas sequências de análises, problema facilmente contornado pelo condicionamento periódico do capilar com a solução.

Azevedo et al. (2014) propõem um método de CZE em modo co-eletrosmótico para a separação de 10 ácidos orgânicos amostras de cachaça, os quais poderiam ser indicadores de qualidade e processamento da bebida. Os ácidos orgânicos alifáticos possuem mobilidade eletroforética relativamente elevadas, o que dificulta sua determinação em modo contra-eletrosmótico, pois alguns analitos apresentam mobilidade eletroforética inferiores à do EOF e por não superar a mobilidade do fluxo não seriam detectados. Por outro lado, em modo co-eletrosmótico, todos os analitos seriam detectados, uma vez que migram na mesma direção do EOF somando suas velocidades, resultando em menores tempos de separação. Desta forma, a superfície interna do capilar foi modificada com quitosana quaternizada para inversão do EOF. As separações foram realizadas em um capilar de sílica fundida de L_{tot} 73 cm (L_{eff} 64,5 cm x 75 μ m d. i.). O BGE utilizado foi composto por 21 mmol L^{-1} β -alanina, 10 mmol L^{-1} ácido 3,5-dinitrobenzóico, pH 3,6. Amostras

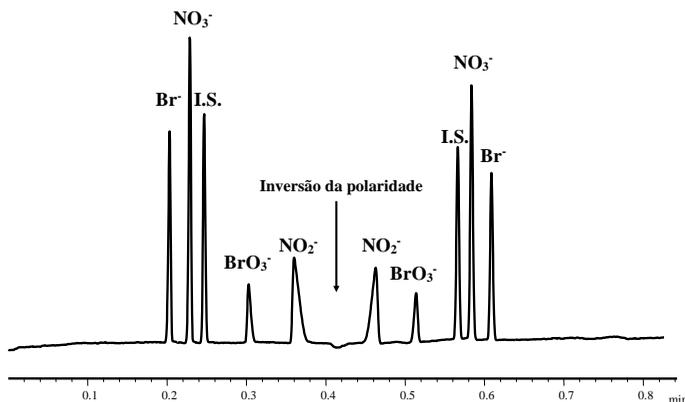
e padrões foram introduzidos no capilar por meio de injeção hidrodinâmica (50 mbar/ 3 s), a tensão aplicada foi 30 kV, com polaridade negativa na extremidade da injeção e detecção indireta a 245 nm, sendo a absorvidade molar conferida pelo ácido 3,5 dinitrobenzóico. O método proposto permitiu a separação dos dez ácidos orgânicos em 9 min (tempo reduzido visto as características dos analitos), e o revestimento manteve-se estável por 40 corridas.

Rizelio et al. (2012) utilizou esta estratégia para a determinação de açúcares em mel. As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida de L_{tot} 60 cm (L_{eff} 8,5 cm x 50 μ m d. i.), o BGE foi composto por 20 mmol L⁻¹ ácido sórbico, 40 mmol L⁻¹ NaOH e 0,2 mmol L⁻¹ CTAB, pH 12,2. Sendo o CTAB aplicado como modificador da superfície interna da capilar para inversão do EOF. As amostras foram introduzidas no capilar utilizando injeção hidrodinâmica de -50 mbar/ 3 s, aplicando tensão de 25 kV, com polaridade negativa na extremidade da injeção e modo de detecção indireta a 254 nm, sendo a absorvidade molar conferida pelo ácido sórbico. A separação dos analitos foi realizada em 1,3 minutos. O reduzido tempo de separação foi alcançado por meio da utilização da separação em modo co-eletrosmótico com EOF de alta magnitude.

3.5 INVERSÃO DA POLARIDADE DURANTE AS CORRIDAS

Neste tipo de estratégia, a polaridade é invertida logo após a detecção dos analitos, fazendo com que estes voltem a passar pelo detector, assim, uma mesma amostra é analisada duas vezes em uma mesma corrida. Como é possível observar na Figura 10, após a inversão da polaridade a ordem de migração dos analitos no eletroferograma também é invertida.

Figura 10 - Representação esquemática da estratégia de inversão de polaridade durante as corridas em CE. Br⁻, brometo; NO₃⁻, nitrato; I.S., padrão interno – Tiocianato; BrO₃⁻, bromato; NO₂⁻, nitrito



Fonte: o próprio autor.

A inversão da polaridade é também uma forma de minimizar a presença de interferentes na separação, pois durante esta inversão compostos neutros ou de carga oposta aos analitos são removidos do capilar pela mudança na polaridade. Para obtenção de dados com maior repetibilidade é recomendável a utilização de I.S. É importante ressaltar que este tipo de injeção não deve substituir a avaliação das amostras em diferentes réplicas de preparo.

Esta estratégia pode ser utilizada em métodos de injeção única, bem como de injeção múltipla de amostras, o que pode aumentar ainda mais a frequência analítica do método. Apesar de apresentar grande potencial de aplicação, ainda é pouco utilizada em CZE, não havendo relatos na literatura até o momento de sua utilização em análise de alimentos.

Um exemplo de utilização desta estratégia na redução do tempo total de análise foi proposto por Micke et al. (2009) durante a determinação de propranolol em fármacos por CZE. As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida de 32 cm ($L_{eff} = 8,5$ cm, d. i. 50 μ m), o BGE foi composto por 60 mmol L⁻¹ TRIS e 30 mmol L⁻¹ de HIBA, pH 8,1. Amostras e padrões foram introduzidos no capilar por meio de injeção hidrodinâmica (-50 mbar/3s), tensão de 30 kV, polaridade positiva na extremidade da injeção e modo de detecção direta a 214 nm. Como I.S., benzilamina foi utilizada. Quando utilizado esta estratégia, foi

possível a separação dos analitos em apenas 28 s, resultando em uma frequência analítica de 45 amostras/ hora.

3.6 ASSOCIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS

Apesar de amplamente utilizadas isoladamente, são raros na literatura os trabalhos que estudam o efeito de diferentes estratégias no tempo total de análise. Um amplo estudo da utilização de estratégias para obtenção de métodos rápidos foi realizado por Geiser, Rudaz e Veuthey (2005). Os autores avaliaram o efeito de sete diferentes estratégias para a redução do tempo total de análise de lidocaína e procaína em fármacos: HEF; modificação da superfície interna do capilar por meio de revestimentos dinâmicos (DC, do inglês, “Dynamic coating”); SEI; MI; Associação entre SEI e aplicação de campos elétricos elevados (SEI-HEF); SEI em capilares com revestimento dinâmico (SEI-DC); SEI-MI.

Utilizando o método convencional sem a utilização das estratégias, a separação dos analitos ocorreu em 4,7 min. Quando aumentado o campo elétrico de 619 para 923 V/cm a separação ocorreu em apenas 1,3 min. A utilização de DC resultou na separação dos analitos em 2,2 minutos, contudo o revestimento permaneceu estável por apenas 15 corridas.

A utilização de SEI resultou na separação dos analitos em apenas 1,2 min. Quando aplicado MI, foi possível separar três amostras simultaneamente em uma corrida de 4,7 min. Por meio das estratégias de SEI-HEF e SEI-DC obteve-se a separação dos analitos em apenas 40 s, enquanto que a utilização de SEI-MI permitiu analisar simultaneamente três amostras em apenas 1,3 min.

Das estratégias avaliadas no estudo a que representou maior redução do tempo total de análise foi a utilização de SEI-MI, pois além do reduzido tempo de separação, a eliminação da etapa de lavagem entre as corridas contribuiu para a frequência analítica.

4 QUÍMICA VERDE

O conceito de química verde foi proposto em 1998 por Anastas e Warner, e está relacionado com a minimização dos impactos ambientais e ocupacionais implícitos aos procedimentos laboratoriais (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2008; TOBISZEWSKI, 2016). Em geral, a execução de métodos analíticos requer a utilização de reagentes, energia e resultam na geração de resíduos.

Nas últimas décadas a comunidade científica têm demonstrado um crescente interesse no desenvolvimento de métodos analíticos seguindo os princípios da química verde. Neste contexto, Gałuszka, Migaszewski e Namieśnik (2013) propuseram os 12 princípios da química analítica verde, os quais consistem em:

1. Utilizar técnicas analíticas que permitam a análise direta, evitando assim procedimentos de preparo de amostras;
2. Minimizar a quantidade e o número de amostras utilizadas nas determinações;
3. Utilizar preferencialmente medidas *in situ*;
4. Integrar etapas do procedimento analítico, de forma a economizar energia e reduzir o uso de reagentes;
5. Considerar a automatização e miniaturização na escolha do método;
6. Evitar procedimentos de derivatização;
7. Evitar a geração de elevados volumes de resíduos, e providenciar o tratamento ou destinação correta destes;
8. Dar preferência a métodos que determinem múltiplos analitos ou múltiplos parâmetros;
9. Reduzir o consumo de energia elétrica;
10. Utilizar preferencialmente reagentes obtidos de fontes renováveis;
11. Eliminar ou substituir reagentes tóxicos utilizados no método;
12. Priorizar a segurança do analista.

Diversos métodos analíticos reivindicam o *status* de química verde, porém, esta alegação advém muitas vezes de uma classificação empírica. Nos últimos anos, algumas ferramentas têm sido propostas para demonstrar de forma quantitativa o quão adequado um método é em relação à química verde, entre estas ferramentas destaca-se a Eco-escala (do inglês, “Eco-scale”) proposta por GAŁUSZKA et al. (2012).

Na Eco-escala, são contabilizados todos os parâmetros que podem gerar algum tipo de impacto ambiental, como por exemplo: a quantidade

de reagentes utilizados, sua toxicidade para o analista e para o meio ambiente; a quantidade de energia consumida para a execução da análise; além da quantidade e destinação dos resíduos gerados (TOBISZEWSKI, 2016; TOBISZEWSKI; ORŁOWSKI, 2015).

Cada um dos parâmetros acima citados é pontuado, e penalizações são atribuídas conforme o potencial de risco apresentado. O valor total das penalizações é descontado de um total de 100 pontos (valor considerado como o ideal para química verde) (MOHAMED, 2015). De acordo com a pontuação obtida o método recebe uma classificação relacionada à sua adequação à química verde, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos métodos analíticos segundo a Eco-escala

Pontuação Eco-escala	Indicação
> 75	Excelente para a química verde
> 50	Adequado para a química verde
< 50	Inadequado para a química verde

Fonte: GAŁUSZKA et al. 2012.

A Tabela 2 ilustra a construção da Eco-escala.

Tabela 2 - Parâmetros para determinação da Eco-escala

Reagentes			(Continua)
		Sub-total penalizações	Total de penalizações
Quantidade	< 10 mL (g)	1	Quantidade x risco
	10-100 mL (g)	2	
	> 100 mL (g)	3	
Risco (físico, ambiental, à saúde)	Nenhum	0	
	Baixo	1	
	Alto	2	
Instrumentos			
Energia	≤ 0,1 kWh por amostra		0
	≤ 1,5 kWh por amostra		1
	> 1,5 kWh por amostra		2
Risco ocupacional	Hermetização do processo		0
	Emissão de gases ou vapores no ar		3

Tabela 2 - Parâmetros para determinação da Eco-escala

		(Conclusão)
Resíduos	Nenhum	0
	< 1 mL (g)	1
	1-10 mL (g)	3
	> 10 mL (g)	5
	Reciclagem ou reuso	0
	Degradação	1
	Passivação	2
	Ausência de tratamento	3

Fonte: Traduzido de GAŁUSZKA et al. 2012.

A avaliação de risco dos reagentes é determinada com base no sistema harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos (GHS, do inglês, “Globally harmonized system of classification and labeling of chemicals”), de forma que uma penalização é dada para cada pictograma de risco correspondente ao composto químico (GAŁUSZKA et al. 2012; TOBISZEWSKI, 2016). A Figura 11 ilustra os principais pictogramas de risco apresentados por produtos químicos.

Figura 11 - Ilustração dos pictogramas de risco apresentado por reagentes químicos segundo a GHS



Fonte: Adaptado de OSHA, 2017.

Os pictogramas de risco e indicações de toxicidade são informações facilmente encontradas na embalagem ou ficha técnica dos reagentes.

Quando um composto é considerado perigoso, o número de pictogramas deve ser multiplicado por 2, enquanto que os reagentes que apenas requerem atenção são multiplicados por 1. Em seguida, o subtotal obtido deve ser multiplicado por um fator relacionado à quantidade do

reagente utilizado. Assim, quanto maior a massa, volume ou periculosidade do reagente utilizado, maior será o fator multiplicador e consequentemente maior a penalização (MOHAMED, 2015).

O volume resultante de resíduos também é pontuado. Quanto maior a geração de resíduos, maior é a penalização recebida. Dependendo da forma de tratamento e/ou disposição do resíduo, é considerado um fator multiplicador, assim, se o resíduo receber tratamento adequado uma menor penalização será aplicada, enquanto que o não tratamento implicará em penalizações mais severas.

Os equipamentos utilizados na análise também são contabilizados, e conforme o gasto energético por amostra uma penalização é aplicada. Alguns exemplos de equipamentos, seus gastos energéticos e suas penalizações são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Consumo de energia por amostra apresentado por algumas técnicas analíticas e sua penalização segundo a Eco-escala

Técnica	Consumo de energia	Penalização
Titulação	≤ 0,1 kWh por amostra	0
Espectrofotômetro UV-Vis		
UPLC		
AAS	≤ 1,5 kWh por amostra	1
GC		
LC		
GC-MS	> 1,5 kWh por amostra	2
LC-MS		

UPLC, Cromatografia líquida de ultra performance, do inglês, “Ultra-performance liquid chromatography”. AAS, Espectrometria de absorção atômica, do inglês “Atomic absorption spectrometry”. GC, Cromatografia à gás, do inglês, “Gas chromatography”. LC, Cromatografia líquida, do inglês, “Liquid chromatography”. MS, Espectrometria de massas, do inglês, “Mass spectrometry”.

Fonte: Adaptado de GAŁUSZKA et al. 2012.

A utilização de métodos instrumentais geralmente contribui para a obtenção de métodos com *status* de química verde, uma vez que estes normalmente são altamente automatizados, tem maior eficiência energética e utilizam quantidades mínimas de amostra. Dentre as técnicas analíticas, a CE é uma das técnicas que mais se enquadra nos princípios da química verde, pois utiliza majoritariamente solventes aquosos, quantidades reduzidas de amostra e resulta em uma quantidade de

resíduos igualmente reduzidos. Além da possibilidade de eliminação de experimentos durante a etapa de desenvolvimento do método pela utilização de *softwares* que permitem a simulação das separações, como por exemplo o *software PeakMaster®* (KALJURAND; KOEL, 2011).

Em alguns casos, a utilização de técnicas analíticas modernas contrasta com procedimentos de preparo de amostras demorados, multi-etapas, e pouco “verdes” (KOEL; KALJURAND, 2006).

Para Tobiszewski e colaboradores (2009) o preparo de amostras é potencialmente a etapa menos “verde” do processo analítico. Por isso, a utilização de processos e reagentes com menor toxicidade e com menor geração de resíduos deve ser um dos principais objetivos durante o desenvolvimento global de um novo método analítico.

5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A obtenção de dados analíticos confiáveis é fundamental em análise de alimentos, uma vez que a emissão de laudos técnicos e a tomada de decisões com base em resultados errôneos pode levar a falsas interpretações e prejuízos financeiros (PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2007). Por isso a validação analítica e o controle de qualidade dos dados são imprescindíveis para assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos em análise de rotina.

A validação analítica consiste no processo de determinação de parâmetros de desempenho e confirmação de que um método atende requisitos de performance necessários à sua aplicação (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014). A validação deve ser realizada quando um método for desenvolvido, modificado ou quando for adaptado para outra amostra (especialmente em relação aos parâmetros seletividade e efeito de matriz).

O processo de validação pode ser dividido em validação intralaboratorial, quando for conduzido em um único laboratório e validação interlaboratorial ou completa quando se tratar de um estudo colaborativo entre laboratórios (TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

Existem diversos guias e protocolos publicados por órgãos nacionais e internacionais que podem ser empregados para a validação de métodos de análise de alimentos. Dentre os quais pode-se destacar os guias propostos pela Eurachem e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro).

Outros protocolos estão disponíveis para aplicação em validação de métodos para análise de alimentos, contudo são desenvolvidos para aplicações específicas, como por exemplo, os guias de validação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Comunidade Europeia (EC, do inglês, “European Commission”) que tratam da validação analítica específica para resíduos e contaminantes em produtos de origem animal. Uma vez que os analitos objeto deste estudo não são resíduos ou contaminantes, estes protocolos não são aplicáveis, por isso maior enfoque será dado aos guias da Eurachem (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014) e Inmetro (2007) que podem ser utilizados para aplicações gerais em alimentos.

A definição dos parâmetros de desempenho avaliados depende do propósito para o qual o método se destina, da técnica escolhida e do protocolo de validação, mas normalmente inclui os parâmetros: linearidade; efeito de matriz; seletividade; precisão; exatidão; limite de detecção (LOD); limite de quantificação (LOQ); e robustez.

A Tabela 4 traz uma compilação dos guias de validação da Eurachem e Inmetro e suas recomendações para avaliação de alguns parâmetros de validação.

Tabela 4 - Compilação dos guias de validação analítica propostos por Eurachem e Inmetro

(Continua)		
Parâmetro	Eurachem	Inmetro
Conformidade do sistema	-	-
Linearidade e faixa de trabalho	<ul style="list-style-type: none"> - Curva de calibração com pelo menos 6 níveis de concentração mais um branco, preparados como réplicas independentes; - Construir gráfico das respostas medidas (y) contra as concentrações do mensurando (x); - Examinar visualmente para identificar a faixa linear aproximada e os limites superior e inferior da faixa de trabalho. - Examinar visualmente a existência de <i>outliers</i> que possam não ser refletidos na regressão. - Calcular coeficiente de regressão linear; - Calcular e construir o gráfico dos valores dos resíduos da regressão. Distribuição aleatória em torno da linha reta indica linearidade. Tendências sistemáticas indicam não linearidade; 	<ul style="list-style-type: none"> - Curva de calibração com pelo menos 7 níveis de concentração, preparados como réplicas independentes; - Construir gráfico das respostas medidas (y) contra as concentrações do mensurando (x); - Verificar visualmente a existência de dispersos que possam interferir na regressão; - Calcular os coeficientes de regressão linear; - Calcular e construir o gráfico dos valores dos resíduos. A distribuição aleatória em torno da linha reta indica linearidade;

Tabela 4 - Compilação dos guias de validação analítica propostos por Eurachem e Inmetro

(Continuação)

Parâmetro	Eurachem	Inmetro
Efeito de matriz	<ul style="list-style-type: none"> - Método de adição de padrão; - Assegurar a linearidade da curva de matriz; 	<ul style="list-style-type: none"> - Erroneamente tratado como seletividade. É conduzido por meio da comparação de curvas dos analitos em solução padrão e curvas em matriz. Recomenda a utilização de 7 réplicas para cada nível de fortificação da curva; - Aplicação do teste F para verificar a homogeneidade de variâncias; - Aplicação do teste <i>t</i> de <i>Student</i> para verificação do efeito de matriz.
Seletividade	<ul style="list-style-type: none"> - Análise de amostras e materiais de referência pelo método em validação e outros métodos independentes; - Análise de amostras contendo os possíveis interferentes e verificar sua influência no sinal analítico. 	-

Tabela 4 - Compilação dos guias de validação analítica propostos por Eurachem e Inmetro

(Continuação)

Parâmetro	Eurachem	Inmetro
Precisão	<ul style="list-style-type: none"> - Analisar padrões, materiais de referência ou amostras “brancas” fortificadas em várias concentrações, ao longo da faixa de trabalho, utilizando 10 réplicas independentes; - Repetitividade: mesmo analista, equipamento, laboratório, em curto intervalo de tempo, dez repetições independentes. - Precisão intermediária: diferentes analistas, equipamentos, mesmo laboratório, em intervalo de tempo estendido, dez repetições independentes. - Reprodutibilidade: diferentes analistas, equipamentos, laboratórios, em intervalo de tempo estendido, dez repetições independentes. Requer estudo colaborativo. - Os resultados para métodos são expressos como desvio padrão para cada concentração, em cada condição; 	<ul style="list-style-type: none"> - Repetitividade: pode ser determinada por meio de análise de padrões, material de referência ou adição em uma amostra “branca” em várias concentrações na faixa de trabalho, utilizando 7 ou mais réplicas independentes. Avaliar a dispersão do resultado por meio do coeficiente de variação (CV); - Precisão intermediária: efetuar n medições de uma mesma amostra, amostras idênticas ou padrões nas condições pré-definidas. Podendo utilizar diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes tempos. Os resultados podem ser avaliados por meio de um gráfico de amplitude ou meio de uma expressão matemática; - Reprodutibilidade: estudo interlaboratorial;

Tabela 4 - Compilação dos guias de validação analítica propostos por Eurachem e Inmetro

(Continuação)

Parâmetro	Eurachem	Inmetro
Exatidão	<p>- Analisar “branco” de reagente e material de referência pelo método em validação, dez vezes. Comparar o valor determinado como valor verdadeiro aceito para o material de referência.</p> <p>- Analisar “branco” de reagente e material de referência/teste pelo método em validação e por um método independente (de preferência primário), dez vezes. Subtrair o valor médio do branco do valor médio do material de referência.</p> <p>- Analisar amostras não fortificadas e amostras fortificadas com o analito de interesse em uma faixa de concentração, seis vezes. Determinar a recuperação do analito nas várias concentrações.</p>	<p>- A exatidão pode ser avaliada por meio da análise de material de referência certificado, ensaios de proficiência e processos colaborativos, comparação de resultados obtidos utilizando métodos de referência, recuperação aparente de amostras fortificadas</p>

Tabela 4 - Compilação dos guias de validação analítica propostos por Eurachem e Inmetro

(Continuação)		
Parâmetro	Eurachem	Inmetro
LOD	<p>- Analisar dez amostras “brancas” independentes. Procedimento válido apenas para os casos em que o desvio padrão da amostra “branca” é diferente de zero. Calcular o desvio padrão dos valores das amostras “brancas”.</p> <p>- Analisar dez amostras “brancas” independentes, fortificadas na menor concentração aceitável (concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado). Calcular o desvio padrão dos valores das amostras fortificadas.</p>	<p>- Analisar sete ou mais amostras “brancas”, válido apenas para casos onde o desvio padrão da amostra “branca” for diferente de zero.</p> <p>- Analisar sete ou mais amostras “brancas” com adição da menor concentração aceitável do analito (concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado);</p>
LOQ	<p>- Analisar dez amostras “brancas” independentes;</p> <p>- Fortificar alíquotas de amostras “brancas” em vários níveis de concentração próximos ao limite de detecção. Medir dez replicatas independentes em cada nível de concentração; Calcular o desvio padrão dos valores das amostras “brancas”.</p>	<p>- Analisar sete ou mais amostras “brancas”.</p> <p>- Analisar sete ou mais amostras “brancas” com adição de concentrações variadas do analito, próximas ao limite de detecção. Calcular o desvio padrão dos valores das obtidos;</p>

Tabela 4 - Compilação dos guias de validação analítica propostos por Eurachem e Inmetro

(Conclusão)		
Parâmetro	Eurachem	Inmetro
Robustez	<ul style="list-style-type: none"> - Identificar os parâmetros cujas variações possam afetar o método analítico; - Recomenda a utilização do teste de Youden; 	<ul style="list-style-type: none"> - Recomenda a utilização do teste de Youden, que consiste em um experimento fatorial em que 7 parâmetros analíticos são selecionados e pequenas variações induzidas nos valores nominais do método, 8 corridas são executadas para determinar a influência de cada parâmetro no resultado final.

Fonte: Magnusson; Ornemark, 2014; Inmetro, 2007.

Como se pode observar na Tabela 4, os protocolos de validação da Eurachem e Inmetro não contemplam o parâmetro conformidade do sistema. Contudo, sua avaliação é recomendável uma vez que assegura que o sistema analítico empregado é adequado para produzir resultados com exatidão e precisão aceitáveis. Este parâmetro é determinado por meio do coeficiente de variação de injeções consecutivas de uma solução de concentração conhecida.

Em relação ao parâmetro linearidade, ambos os protocolos recomendam o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), no qual devem ser atendidas as premissas de normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos. Quando os dados obtidos não apresentam distribuição normal, são heterocedásticos ou apresentam dependência o MMQO não é apropriado, sendo recomendável então realizar a transformação matemática dos dados ou utilização de outros modelos como o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) ou mínimos quadrados generalizados (MMQG). É comum a utilização do valor de R^2 como indicação de linearidade, no entanto, esta é uma afirmação errônea, pois este parâmetro não demonstra

necessariamente que o ajuste do modelo aos dados experimentais foi linear, e sim que os dados estão bem ajustados.

A avaliação do efeito de matriz também tem sido negligenciada por alguns protocolos de validação. Sua avaliação é essencial, especialmente em amostras complexas como os alimentos, cujos componentes podem atuar aumentando ou reduzindo o sinal analítico (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998). Normalmente sua determinação é conduzida utilizando amostras brancas, entretanto para sua avaliação em amostras desconhecidas, complexas, ou na ausência de amostras brancas, o método mais indicado é o de adição de padrão.

O guia de validação do Inmetro denomina erroneamente o efeito de matriz como sendo seletividade, contudo estes parâmetros são conceitualmente diferentes, uma vez que o efeito de matriz é definido como uma mudança no sinal analítico causado por componentes da amostra diferentes do analito, enquanto que a seletividade é definida como a capacidade de um método quantificar com exatidão e precisão o analito de interesse na presença de interferentes (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Em validações intralaboratoriais o parâmetro precisão é geralmente determinado por meio da repetibilidade e precisão intermediária, variando o analista, o equipamento, ou o período de tempo entre a realização dos ensaios. Enquanto que nos processos de validação interlaboratorial, determina-se também a reprodutibilidade do método, variando sempre que possível os operadores, os instrumentos e outros fatores experimentais.

Os estudos interlaboratoriais são baseados na premissa da participação de vários laboratórios. O organizador do estudo distribui um material comum a todos os laboratórios, coleta, avalia os dados analisados pelos participantes, além de organizar a discussão dos resultados. Para que haja a comparação dos resultados obtidos, todos os participantes devem receber amostras idênticas, por isso a estabilidade e homogeneidade das amostras devem ser comprovadas pelo organizador (AOAC INTERNATIONAL, 2005; MAIER; QUEVAUVILLER, 1999).

A utilização de amostras “brancas” (isentas dos analitos do foco de estudo) e material de referência são recomendações constantes para a avaliação da exatidão. Porém a disponibilidade de ambas e o custo elevado de materiais de referência tornam sua utilização limitada em análise de alimentos. Sendo determinada muitas vezes por meio da avaliação da recuperação, os quais muitas vezes são questionados por que os analitos encontram-se livres na amostra e, portanto, são mais

facilmente detectados, sendo que a nomenclatura mais adequada seria “recuperação aparente”.

Ambos os protocolos de validação sugerem a determinação dos LOD e LOQ por meio da fortificação de amostras “brancas”, contudo em análise de alimentos a disponibilidade destas é muitas vezes restrita. Nesses casos as determinações podem ser realizadas por meio da relação sinal/ruído obtida utilizando solução padrão.

Quando se trata da avaliação da robustez o teste de Youden é praticamente um consenso entre os protocolos de validação, uma vez que permite determinar vários parâmetros simultaneamente. Contudo, há a necessidade de desenvolvimento de métodos estatísticos mais completos para a avaliação da robustez. Uma alternativa ao teste de Youden é a utilização de outros métodos de planejamento de experimentos como por exemplo, os experimentos fatoriais fracionados ou delineamento Plackett–Burman.

Além dos parâmetros previamente discutidos, a incerteza de medição é também um parâmetro para avaliação da qualidade dos dados analíticos quantitativos. O termo incerteza se refere a um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando. Na prática as principais etapas envolvidas em sua avaliação são a especificação do mensurado, a identificação das fontes de incerteza, a quantificação dos componentes de incerteza e o cálculo da incerteza combinada (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2002; MEYER, 2007).

A incerteza de uma medida pode provir de várias fontes, e cabe ao analista identificá-las atentamente. Geralmente esta avaliação é estruturada utilizando um diagrama de causa e efeito, também conhecido como diagrama Ishikawa ou “espinha de peixe”. Normalmente estudos preliminares identificarão as fontes de incerteza mais significativas, pois são elas que irão contribuir majoritariamente para a correta estimativa deste parâmetro (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2002). A Eurachem possui um guia completo, ilustrativo e traduzido para a língua portuguesa que contempla todos os aspectos da incerteza de medição.

Segundo o guia de validação e controle da qualidade analítica do Mapa (BRASIL, 2011), para a maioria dos fins, deve-se usar uma incerteza expandida, (U), pois esta fornece um intervalo dentro do qual o valor do mensurando apresenta um maior grau de confiança. Sendo este parâmetro obtido pela multiplicação da incerteza padrão combinada, $u_c(y)$, por um fator de abrangência k . A escolha do fator k é baseada no

nível de confiança desejado. Para um nível de confiança aproximado de 95%, k é igual a 2.

CAPÍTULO 2 – MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM PRODUTOS CÁRNEOS UTILIZANDO SEI-CZE-UV: UMA ALTERNATIVA PARA ANÁLISE DE ROTINA.

MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM PRODUTOS CÁRNEOS UTILIZANDO SEI-CZE-UV: UMA ALTERNATIVA PARA ANÁLISE DE ROTINA

RESUMO

Neste capítulo um método de eletroforese capilar de zona foi modificado e um procedimento de preparo de amostras foi desenvolvido para a determinação simultânea de nitrato e nitrito em produtos cárneos. As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida de dimensões 48,5 cm, sendo 8,5 cm comprimento efetivo, 75 μm de diâmetro interno. O BGE utilizado no método proposto foi composto por 20 mmol L^{-1} de ácido perclórico e 65 mmol L^{-1} de β -alanina em pH 3,83. Tiocianato foi utilizado como padrão interno (I.S.) na concentração final de 6 mg L^{-1} . O preparo de amostras desenvolvido consistiu na extração dos analitos sob aquecimento em meio alcalino, seguido de filtração, diluição e injeção do sistema de eletroforese. O método proposto foi validado e a incerteza foi estimada de acordo com os protocolos da Eurachem. A adequação do método em relação aos princípios da química verde foi determinada utilizando a Eco-escala, e o mesmo mostrou-se ambientalmente amigável. O método também foi avaliado através da participação em um ensaio de proficiência. O desempenho analítico confirmou a adequação do método, que foi aplicado para analisar 13 amostras de produtos cárneos, das quais uma apresentou níveis de nitrito residual acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira (150 mg kg^{-1}). A associação entre método rápido e simples preparo de amostras faz deste trabalho uma possível alternativa para aumentar a frequência analítica em laboratórios de análise de rotina.

Palavras-chave: Análise de rotina; produtos cárneos; validação analítica.

1 INTRODUÇÃO

Os íons nitrato e nitrito são importantes aditivos alimentares que têm sido utilizados por séculos nos processos de cura das carnes, uma vez que desenvolvem e estabilizam a cor, inibem micro-organismos deteriorantes e importantes patógenos de origem alimentar, retardam a rancidez oxidativa, desenvolvem aroma e sabor desejáveis (KOUTSOUMANIS; GEORNARAS; SOFOS, 2006; WEISS et al., 2010).

Apesar de sua efetividade ser bem estabelecida, sua utilização tem sido contestada, devido aos aspectos toxicológicos e possibilidade de exercerem efeitos negativos à saúde dos consumidores. O nitrato apresenta valor de ingestão diária aceitável (IDA) de até 3,7 mg por kg de peso corpóreo dia, mas quando ingerido pode ser reduzido a nitrito por bactérias presentes na cavidade bucal, cuja IDA é de até 0,06 mg por kg de peso corpóreo por dia (JECFA, 2015a,b). O consumo de produtos com elevadas concentrações de nitrito oferece risco à saúde, doses de nitrito de 15 a 20 mg kg⁻¹ de peso corpóreo podem ser letais, todavia os níveis máximos permitidos são significativamente inferiores e desde que seguido os níveis recomendados não há risco de intoxicação aguda (SANTAMARIA, 2005).

O principal efeito tóxico do consumo agudo do íon nitrito é a ocorrência de metemoglobinemia, uma síndrome causada pelo aumento da concentração de metemoglobina no sangue, devido à oxidação da hemoglobina à metemoglobina, um composto incapaz de transportar o oxigênio no sangue. A metemoglobinemia pode ser fatal, principalmente em crianças recém-nascidas (SANTAMARIA, 2005; CAMMACK et al., 1999).

Nas últimas décadas, as atenções se voltaram para a potencial formação de compostos carcinogênicos derivados dos nitritos, os compostos N-nitrosos. Estes compostos são formados pela nitrosação de aminas primárias e secundárias, e o principal agente nitrosante é o ácido nitroso gerado a partir do nitrito (ANDRÉE et al., 2010; HONIKEL, 2008).

Visando minimizar os efeitos tóxicos do nitrito, os órgãos reguladores têm diminuído nas últimas décadas as concentrações máximas permitidas destes aditivos em vários países. Embora os níveis atualmente permitidos para produtos cárneos sejam considerados seguros, existem discussões para que se reduza ainda mais ou elimine o uso destes aditivos (SINDELAR; MILKOWSKI, 2012).

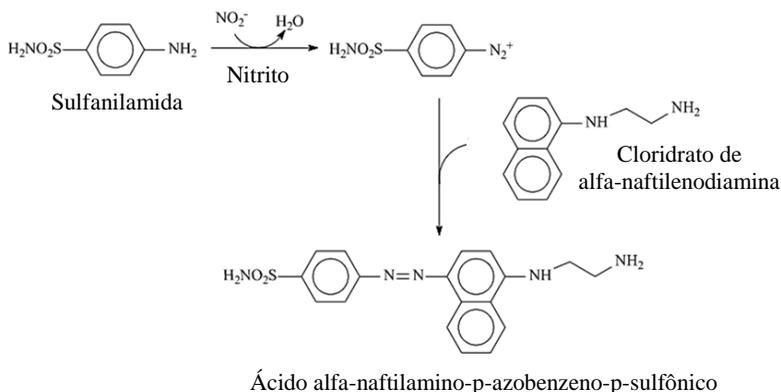
Em 2015, a Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês, “World Health Organization) por meio da Agência Internacional de pesquisa em câncer (IARC, do inglês, “International Agency for Research on Cancer”) classificou o consumo de produtos cárneos processados (salgados, curados, fermentados, defumados) como grupo 1, carcinogênicos para humanos, baseados em suficientes evidências de que seu consumo causa câncer colorretal. Ainda segundo a IARC, o consumo diário de uma porção de 50 g de carne processada aumenta em 18% o risco de câncer colorretal (IARC, 2015). Esses indícios reforçam ainda mais a necessidade de controle dos compostos potencialmente carcinogênicos em produtos cárneos.

A comunidade europeia por meio da Diretiva 52 de 05 de julho de 2006, estabelece 150 mg kg^{-1} como limite para os teores de nitrato em produtos não tratados termicamente, com exceção para alguns produtos específicos (por exemplo, bacon e presunto 250 mg kg^{-1}), enquanto que os nitritos (de sódio ou potássio) são limitados a 150 mg kg^{-1} salvo algumas exceções (EUROPEAN COMMISSION, 2006).

No Brasil a Instrução Normativa 51, de 29 de dezembro de 2006 do Mapa atribui os aditivos permitidos e suas quantidades para utilização em produtos cárneos. Os limites máximos permitidos são 150 mg kg^{-1} e 300 mg kg^{-1} para nitrito e nitrato de sódio e potássio, respectivamente (BRASIL, 2006). Baseado na norma do Mercosul, o Mapa determina ainda que quando nitrato e nitrito forem utilizados combinadamente em processos de cura, os resultados da determinação devem ser expressos como nitrito residual e o limite máximo permitido não deve exceder 150 mg kg^{-1} de produto (BRASIL, 2009).

A determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos faz parte da análise de rotina no controle de qualidade destes produtos, e os métodos mais empregados para estas determinações são os métodos normalizados da ISO e da AOAC (AOAC INTERNATIONAL, 2005a; ISO, 1975 a, b). Ambos os métodos se baseiam na reação de Griess, que consiste na diazotização dos nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea, que é determinado espectrofotometricamente (reação apresentada na Figura 12). Entre eles o método da ISO diferencia-se principalmente pelo uso dos reagentes Carrez I (ferrocianeto de potássio) e Carrez II (acetato de zinco) para desproteíntização. No Brasil, o MAPA recomenda a utilização do método proposto pela ISO (BRASIL, 1999).

Figura 12 - Representação esquemática da reação de Griess.



Fonte: Adaptado de Ramos et al., 2006.

Os métodos recomendados pela AOAC e pela ISO para a determinação de nitrato e nitrito apresentam várias características que os tornam indesejáveis para laboratórios com grande demanda de análise. Entre as principais desvantagens estão a complexidade dos métodos, baixa frequência analítica, como consequência dos longos tempos requeridos para a análise, determinação de apenas um analito por análise, elevado consumo de materiais de laboratório e reagentes, sendo que muitos destes reagentes são corrosivos ou tóxicos (e. g. cádmio, ferrocianeto de potássio) e resultam em elevada geração de resíduos (RINCÓN; MARTÍNEZ; DELGADO, 2003; RINCÓN, et al., 2008; RUIZ-CAPILLAS; ALLER-GUIOTE; JIMENEZ-COLMENERO, 2007).

Apesar dos métodos espectrométricos serem os mais utilizados na determinação destes ânions em alimentos, outras técnicas analíticas têm sido reportadas na literatura dentre essas a análise por injeção em fluxo acoplado a espectrofotometria (ANDRADE et al., 2003; RUIZ-CAPILLAS; ALLER-GUIOTE; JIMENEZ-COLMENERO, 2007), voltametria (SANTOS et al., 2009; TURDEAN; SZABO, 2015), cromatografia (ARMENTEROS; ARISTOY; TOLDRÁ, 2012; LOPEZ-MORENO; PEREZ; URBANO, 2016; MERINO et al., 2000; MCMULEN et al., 2005) e eletroforese capilar (DELLA BETTA et al., 2014; JASTRZĘBSKA, 2010; MERUSI et al., 2010; ÖZTEKIN; NUTKU; ERIM, 2002).

Embora os métodos acima citados possibilitem a separação dos analitos em tempos relativamente reduzidos, alguns apresentam desvantagens semelhantes às dos métodos oficiais no preparo de amostras utilizado, especialmente em relação ao tempo requerido, envolverem múltiplas etapas, elevado consumo de reagentes, geração de resíduos. Um exemplo disso é o método proposto por MERINO et al. (2000) em associação com o NMKL (do inglês, “Nordic Committee on Food Analysis”). Os autores desenvolveram um método para determinação de nitrato e nitrito em alimentos utilizando cromatografia líquida. A separação dos analitos foi obtida em aproximadamente 10 min, e, além do longo tempo de separação, o método apresenta desvantagens relacionadas a eficiência e utilização de solventes orgânicos na fase móvel (acetonitrila), o que aumenta os impactos ambientais e ocupacionais associados a determinação.

Das técnicas acima citadas a CE apresenta potencial para aplicação no desenvolvimento de métodos rápidos, de baixo custo e com menores impactos ambientais para determinação simultânea de nitrato e nitrito.

Della Betta e colaboradores (2014) desenvolveram e validaram um método por SEI-CZE para a determinação simultânea de nitrato e nitrito. O método proposto foi capaz de separar os analitos em menos de 30 s, utilizando um simples preparo de amostras. O processo de validação foi realizado conforme o protocolo da Eurachem e todos os parâmetros de desempenho foram satisfatórios. Quando aplicado em amostras de alimentos infantis, o método apresentou elevada frequência analítica e demonstrou potencial para aplicação em outras matrizes alimentícias.

Visto a classificação dos produtos cárneos processados como carcinogênicos para humanos pela IARC e a importância de determinar os íons nitrato e nitrito nessa matriz, o objetivo deste trabalho foi:

- i. Modificar o método de separação por SEI-CZE proposto por Della Betta et al. (2014), a fim de adequá-lo à aplicação em produtos cárneos;
- ii. Desenvolver um procedimento de preparo de amostras adequado para as amostras de produtos cárneos, que seja de fácil execução, baixo custo, baixa geração de resíduos e que forneça alta frequência analítica;
- iii. Avaliar a adequação do método em relação aos princípios da química verde utilizando a Eco-escala;
- iv. Devido as modificações no método, revalidá-lo segundo o protocolo da Eurachem avaliando os parâmetros: linearidade; efeito de matriz; seletividade; precisão; exatidão; LOD; LOQ; robustez e medida de incerteza.

- v. Aplicar o método na determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos para verificar o cumprimento das legislações vigentes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E PADRÕES

Todas as soluções padrões utilizadas foram preparadas com reagentes de grau analítico com alto teor de pureza e água desionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA). Os reagentes nitrato, nitrito, oxalato, bromato e brometo de sódio, tiocianato de potássio, ácido perclórico (70%), β -alanina e tetraborato de sódio decahidratado foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich (St. Louis, CO, E.U.A), hidróxido de sódio foi obtido junto a Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

As soluções padrões de nitrato, nitrito e tiocianato (1000 mg L^{-1}) e as soluções de ácido perclórico e β -alanina (100 mmol L^{-1}) foram preparadas e armazenadas a 4°C até o momento da análise, e através de diluições obtiveram-se as concentrações desejadas.

2.2 INSTRUMENTAL

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar modelo 7100 da marca Agilent Technologies (Palo Alto, EUA.), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), controlador de temperatura e programa de aquisição e tratamento de dados fornecido pelo fabricante (*HP ChemStation*[®]).

Antes do primeiro uso o capilar foi condicionado com 1 mol L^{-1} NaOH (30 min) e água desionizada (30 min). No início de cada dia, realizou-se condicionamento por meio de lavagem com 1 mol L^{-1} NaOH por 10 min, seguido pela lavagem com água desionizada por 10 minutos e solução de BGE por 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 mol L^{-1} NaOH (10 min) e água (10 min).

As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida de 48,5 cm, sendo 8,5 cm comprimento efetivo, $75 \mu\text{m}$ 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°C . As amostras e os padrões foram introduzidos por meio de SEI com pressão hidrodinâmica de -50 mbar por 4 s. A tensão utilizada na separação foi -30 kV (polaridade negativa no local de injeção).

O BGE utilizado no método proposto foi composto por ácido perclórico (20 mmol L^{-1}) e β -alanina (65 mmol L^{-1}), pH 3,83 (pH calculado utilizando o software *PeakMaster*[®] a partir das concentrações

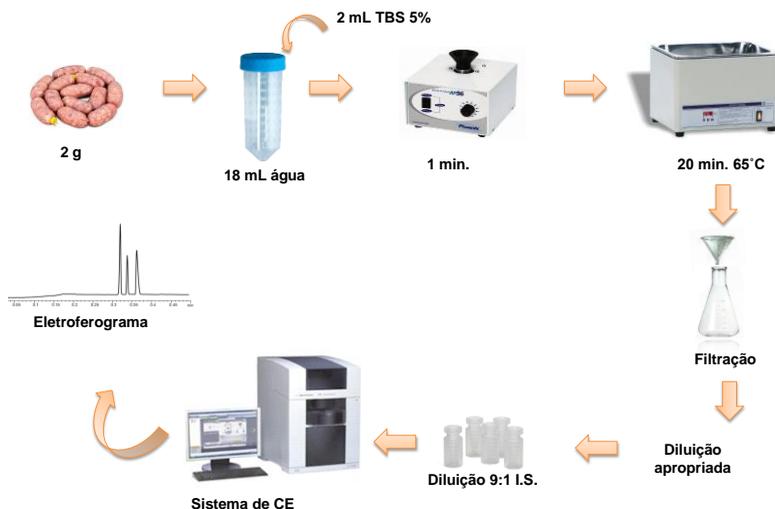
de cada componente). O íon tiocianato foi utilizado como I.S. na concentração final de 6 mg L^{-1} .

2.3 AMOSTRAS E PREPARO DE AMOSTRAS

As amostras de produtos cárneos foram previamente trituradas e homogeneizadas e 2 g foram dispostas em um tubo de polietileno. 18 mL de água desionizada e 2 mL de tetraborato de sódio decahidratado (TBS) 5% foram adicionados, e a mistura resultante foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e depois mantida em banho maria a $65 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos (agitando ocasionalmente os tubos).

Após a extração, a solução contendo a amostra foi resfriada, agitada mecanicamente e filtrada em filtro de papel nº 1. Em seguida, alíquotas do filtrado foram transferidas para microtubos, diluídas com água desionizada quando necessário e a solução resultante foi então diluída na proporção de 9:1 (v/v) com I.S. (concentração final 6 mg L^{-1}) e então analisadas quanto ao teor de nitrato e nitrito no equipamento de CE. Todas as amostras foram analisadas em triplicata de preparo após a abertura da embalagem, e dentro do prazo de validade indicado no rótulo (Figura 13).

Figura 13 - Representação esquemática do preparo de amostras para determinação de nitrato e nitrito



Fonte: o próprio autor.

2.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Os experimentos de validação seguiram o protocolo da Eurachem (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014) e contemplaram os parâmetros: conformidade do sistema; linearidade; efeito de matriz; seletividade, precisão; LOD; LOQ; robustez e estimativa da incerteza.

Para o estudo de validação, as amostras foram divididas em cinco categorias de acordo com a classificação presente na Instrução Normativa 51 de 29 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

- (1) **Produtos cárneos industrializados frescos embutidos ou não embutidos:** linguiça frescal, hambúrguer, cortes temperados.
- (2) **Produtos cárneos industrializados secos, curados e/ou maturados ou não:** salame, bacon, charque, presunto cru, copa, linguiça dessecada.
- (3) **Produtos cárneos industrializados cozidos embutidos ou não embutidos:** salsicha, mortadela, presunto, apresuntado, lanche, morcela, empanados, linguiça tipo calabresa.
- (4) **Produtos cárneos salgados crus:** carne salgada, lombo, pernil salgado.
- (5) **Produtos cárneos salgados cozidos:** costela salgada defumada, lombo defumado.

A partir da classificação citada, foram escolhidas uma amostra para representar cada uma das categorias, para as quais escolheu-se linguiça de pernil, salame tipo italiano, salsicha, carne suína salgada *in natura* e costela suína salgada defumada. Os resultados obtidos referentes aos parâmetros de validação foram considerados válidos para amostras da mesma categoria.

2.4.1 Conformidade do sistema

A avaliação do parâmetro conformidade do sistema foi realizada por meio do coeficiente de variação (CV – equação 1) das médias obtidas de dez injeções consecutivas de solução padrão a uma dada concentração. Os parâmetros avaliados foram área corrigida ($\text{Área}_{\text{analito}}/\text{Área}_{\text{I.S.}}$) e tempo de migração corrigido ($t_{m \text{ analito}}/t_{m \text{ I.S.}}$).

$$\text{CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (1)$$

Sendo: S, desvio padrão; \bar{x} , média.

2.4.2 Faixa de trabalho e linearidade

A faixa de trabalho foi construída de forma a contemplar os limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira, 300 e 150 mg L⁻¹, para nitrato e nitrito de sódio, respectivamente (BRASIL, 2006), com concentrações variando de 1 a 12 mg L⁻¹ para o íon nitrato e de 0,5 a 6 mg L⁻¹ para o íon nitrito.

Para a avaliação da linearidade, curvas em solução padrão foram construídas em sete níveis de concentração, preparadas em triplicata e analisadas de forma aleatória no equipamento de CE.

Após a aquisição de dados, foram construídos gráficos das áreas corrigidas *versus* as concentrações do mensurado, regressão linear e foram construídos gráficos dos resíduos da regressão, a fim de verificar a presença de tendências e/ou presença de valores discrepantes (*outliers*). A distribuição aleatória e ausência de tendências indicam possível linearidade.

Depois da inspeção visual, os possíveis *outliers* foram submetidos ao teste de Grubbs para confirmação, sendo possível a remoção de valores discrepantes em até 22,2 % do total de dados (GRUBBS, 1969).

Os parâmetros da curva de calibração em solução aquosa foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), e para verificação das premissas referentes ao MMQO 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). Todos os testes com nível de significância $\alpha=0,05$.

2.4.3 Efeito de matriz

Para avaliação do efeito de matriz curvas de calibração em matriz foram construídas em sete níveis de concentração (1-12 mg L⁻¹ e de 0,5-6 mg L⁻¹, para os íons nitrato e nitrito, respectivamente), preparadas em três réplicas independentes e analisadas de forma aleatória.

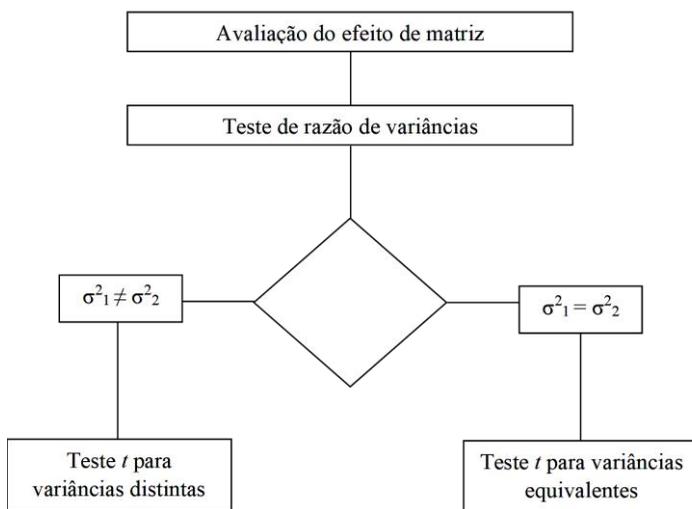
Devido à dificuldade de obtenção de amostras brancas ou matriz de referência certificada, as curvas foram construídas utilizando o método de adição de padrão, que consiste na adição de concentrações conhecidas de solução dos analitos à solução de amostra.

A solução de amostra utilizada na construção das curvas foi obtida nas condições de extração e diluição ensaiadas para uma quantificação de

rotina, de forma a reproduzir fielmente a presença de possíveis substâncias interferentes e as características da matriz.

A linearidade das curvas em matriz foi avaliada como descrito previamente no item 2.4.2 deste capítulo, e após sua confirmação as curvas em matriz das cinco classes de produtos cárneos foram avaliadas quanto ao parâmetro efeito de matriz por meio da aplicação teste *t-Student*. Para definir qual o tipo de teste *t* a ser empregado, realizou-se o teste *F*, como recomendado por Bruce, Minkkinen e Riekkola (1998), a utilização dos testes é ilustrada a seguir na Figura 14.

Figura 14 - Representação esquemática da avaliação do efeito de matriz utilizando o teste *t-Student*



Fonte: o próprio autor.

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. Assim, 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, 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 (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998). No teste de hipóteses considerou-se a equivalência estatística dos coeficientes

angulares das curvas em solução aquosa e em matriz como sendo a hipótese nula (H_0), e a existência de diferença significativa entre os referidos coeficientes angulares como hipótese alternativa (H_1).

2.4.4 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada experimentalmente por meio da injeção de uma mistura de soluções padrões dos analitos, I.S. e os possíveis interferentes (bromato, brometo e oxalato) nas condições de separação previamente descritas na seção 2.2 deste capítulo.

2.4.5 Precisão

A repetibilidade foi determinada a partir de três injeções consecutivas de soluções dos padrões dos analitos e I.S. em três níveis de concentração. Para determinação da precisão intermediária, foram realizadas injeções de soluções padrões dos analitos e I.S. em três níveis de concentração em três dias distintos.

Os resultados foram expressos como % CV (equação 1) para os parâmetros tempo de migração corrigido ($t_{m(\text{analito})}/t_{m(\text{P.I.})}$) e área corrigida ($\text{área}(\text{analito})/\text{área}(\text{P.I.})$).

2.4.6 Exatidão

A exatidão do método foi determinada por meio de ensaios de recuperação aparente. Onde, amostras foram fortificadas em três níveis de concentração e analisadas em três réplicas independentes. As amostras que não apresentaram efeito de matriz foram calculadas a partir da equação 2, que relaciona a concentração determinada na amostra fortificada, na amostra não fortificada e a concentração utilizada na fortificação das amostras.

$$Rec = \frac{\text{Conc. amostra fortificada} - \text{Conc. não fortificada}}{\text{Conc. adicionada}} \times 100 \quad (2)$$

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

$$Rec = \frac{\text{Conc. amostra fortificada}}{\text{Conc. adicionada}} \times 100 \quad (3)$$

Para os cálculos de recuperação de amostras que apresentam efeito de matriz, somente são considerados a relação entre a concentração obtida da amostra fortificada e a concentração adicionada. Neste tipo de situação não é necessário subtrair a concentração da amostra não fortificada, uma vez que esta já está inserida na curva de calibração ao considerarmos $y=0$.

2.4.7 LOD e LOQ

O LOD do método foi estabelecido como a menor concentração detectada dos analitos em solução padrão, equivalente a três vezes a relação sinal/ruído. O LOQ foi estabelecido como a menor concentração equivalente a dez vezes a relação sinal/ruído. Ambos os parâmetros foram determinados a partir de diluições do ponto inferior da curva de calibração em solução padrão.

2.4.8 Robustez

A robustez foi avaliada utilizando o teste de Youden (YOU DEN; STEINER, 1975). Inicialmente foram identificados os sete parâmetros cujas variações poderiam afetar o desempenho do método analítico, assim foram escolhidos para a avaliação da robustez os parâmetros: tensão aplicada; pH do BGE; temperatura de separação; pressão de injeção; comprimento de onda; tempo de lavagem entre corridas; e tempo de injeção.

Após a seleção dos parâmetros analíticos, pequenas variações foram induzidas nos valores nominais do método. Oito corridas foram então realizadas para determinar a influência de cada parâmetro nas respostas: concentração de nitrato e nitrito (mg kg^{-1}); área corrigida para nitrato e nitrito ($\text{Área}_{\text{analito}}/\text{Área}_{\text{I.S.}}$); tempo de migração corrigido ($t_{\text{manalito}}/t_{\text{mI.S.}}$); simetria e resolução.

As condições nominais representadas por letras maiúsculas e alteradas representadas por letras minúsculas são apresentadas na Tabela 5 e o delineamento experimental para a execução do teste na Tabela 6.

Tabela 5 - Parâmetros analíticos avaliados no teste de Youden, condições nominais e alteradas.

Parâmetro analítico	Condição nominal	Condição alterada
Tensão (kV)	30 (A)	29 (a)
pH	3,96 (B)	3,78 (b)
Temperatura (°C)	25 (C)	26 (c)
Pressão (mbar)	50 (D)	48 (d)
Comprimento de onda (nm)	210 (E)	212 (e)
Lavagem entre corridas (s)	60 (F)	50 (f)
Tempo de injeção (s)	4 (G)	5 (g)

Fonte: o próprio autor.

Tabela 6 - Delineamento experimental empregado no teste de Youden.

Parâmetros analíticos	Condição experimental							
	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
Lavagem entre corridas (s)	F	f	f	F	F	f	f	F
Tempo de injeção (s)	G	g	g	G	g	G	G	G
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: o 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 dos efeitos para o parâmetro tensão é mostrado na equação 4:

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

2.4.9 Incerteza de medição

A incerteza de medição (U) para a determinação de nitrato e nitrito foi calculada seguindo o guia de medição de incerteza da Eurachem (ELLISSON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2002), considerando um fator de

cobertura (k) igual a 2 (Equação 5). A incerteza combinada (U) foi determinada levando em consideração as seguintes fontes de incerteza:

- Curvas de calibração (u_{cc}): pureza dos padrões, preparo da solução estoque (massa, volume); preparo da curva (diluções);
- Repetibilidade (u_{rep});
- Precisão intermediária (u_{ip});
- Recuperação (u_{rec});
- Preparo de amostras (u_{sp}): massa de amostra, volume, vidrarias, diluições.

$$U = k * \sqrt{u_{cc}^2 + u_{rep}^2 + u_{ip}^2 + u_{rec}^2 + u_{sp}^2} \quad (5)$$

2.4.10 Ensaio de proficiência

O Instituto Adolfo Lutz (IAL) organizou um teste de proficiência para avaliar a capacidade de os participantes determinarem nitrato e nitrito em produtos cárneos. Trinta e dois laboratórios brasileiros públicos e privados participaram do ensaio de proficiência, cada qual recebendo uma amostra para análise. Dentre os participantes apenas dois laboratórios utilizaram a técnica de CE, as demais instituições utilizaram predominantemente métodos espectrofotométricos.

O material de referência foi preparado e a homogeneidade foi certificada pelo organizador. A amostra de proficiência, um salsichão tipo Lionês (Figura 15), foi preparado e analisado em três réplicas independentes de acordo com o método proposto neste trabalho.

Figura 15 - Amostra de salsichão tipo Lionês utilizada no ensaio de proficiência



Fonte: o próprio autor.

Os resultados das análises realizadas utilizando o método proposto foram enviados ao organizador do teste para avaliação dos resultados. A

interpretação dos resultados foi dividida pelo organizador da seguinte forma:

- $z \leq 2$, satisfatório ou aceitável,
- z entre > 2 e < 3 , questionável;
- $z > 3$ insatisfatório ou inaceitável;

2.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após o desenvolvimento do procedimento de preparo de amostras e da validação analítica, o método proposto foi aplicado à análise de 13 amostras de produtos cárneos de diferentes categorias e marcas, adquiridas no mercado local da cidade de Florianópolis (SC) e mantidas sob refrigeração (5 ± 2 °C) até o momento das análises. Das amostras avaliadas sete eram oriundas de estabelecimentos sob inspeção federal (SIF) e seis de inspeção estadual (SIE).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a construção das curvas de calibração e a determinação dos resíduos da regressão utilizou-se o *software* Microsoft Excel 2013. As premissas de normalidade e homocedasticidade foram avaliadas utilizando o *software* Assistat 7.7 (software livre), enquanto que os testes de independência e ajuste ao modelo linear foram calculados utilizando o *software* Statistica 12.0.

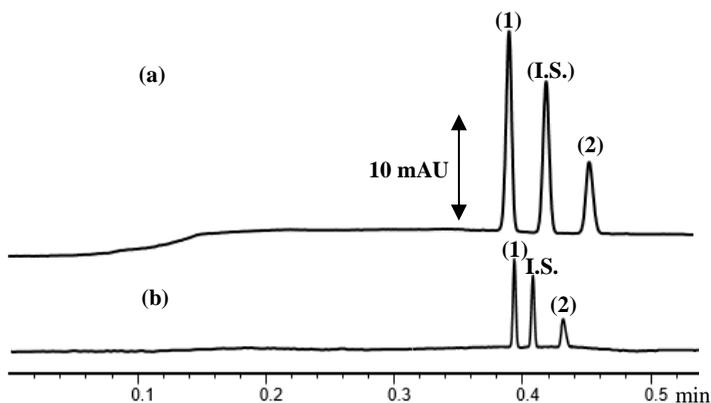
Todos os testes estatísticos foram realizados com nível de confiança de 95%. A quantificação das amostras foi realizada em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MÉTODO POR CZE

As separações foram conduzidas a partir de modificações do método de SEI-CZE proposto por Della Betta e colaboradores (2014). Para aumentar o sinal de resposta do analito no detector, o diâmetro interno do capilar foi aumentado de 50 para 75 μm e o tempo de injeção passou de 3 para 4 s, o que resultou em um importante aumento no sinal analítico, ilustrado na Figura 16. Com o objetivo de minimizar a corrente elétrica e o efeito Joule resultantes do aumento do diâmetro interno, o tamanho do capilar foi aumentado de 32 para 48,5 cm.

Figura 16 - Eletroferogramas que ilustram o aumento da detectabilidade a partir das modificações do método original. (a) método otimizado; (b) método original proposto por Della Betta et al. (2014). Sendo: (1) nitrato, (I.S.) – tiocianato, (2) nitrito



Fonte: o próprio autor.

O BGE do método proposto por Della Betta et al. (2014) era composto por 10 mmol L^{-1} de ácido perclórico e 40 mmol L^{-1} de β -alanina. Devido à alta força iônica das amostras de produtos cárneos, para aumentar a capacidade tamponante e conseqüentemente garantir a estabilidade por mais corridas as concentrações dos componentes do BGE foram alteradas. Essa modificação foi realizada por meio de simulações utilizando o *software PeakMaster*[®] e as concentrações satisfatórias para separação dos analitos em linha de base foram definidas como sendo 20 mmol L^{-1} de ácido perclórico e 65 mmol L^{-1} de β -alanina, condição que

resultou em um aumento da capacidade tamponante de 17 para 33 mmol L⁻¹.

Devido à complexidade das amostras, o tempo de lavagem entre corridas passou de 30 para 60 s, de forma a assegurar a limpeza do capilar. Os demais parâmetros de separação não foram alterados.

A utilização da associação das estratégias de SEI-CZE e elevado campo elétrico (937,5 V/cm) do método original foi mantida, assegurando o reduzido tempo de separação do mesmo (30 s). Todas as modificações foram realizadas de forma a adequar o método para sua aplicação em produtos cárneos, mantendo sua adequada resolução e seu reduzido tempo de separação.

O tempo total de análise em CE, incluindo lavagem entre corridas, permutação de reservatórios de BGE e amostra, injeção da amostra e separação foi de 2:35 min (141 s), o que permitiu a análise de aproximadamente 25 amostras por hora, satisfazendo as necessidades de laboratórios de rotina, onde a demanda por análises é elevada e a alta frequência analítica é necessária.

3.2 PREPARO DE AMOSTRAS

O método de extração explorou a solubilidade dos íons nitrato e nitrito em água. A temperatura de extração definida foi 65 ± 2 °C, temperatura adequada, visto que em temperaturas superiores o nitrito poderia reagir com aminas presentes na matriz e resultar na formação de nitrosaminas, conseqüentemente ocasionando perdas na quantificação (FIDLER; FOX, 1978; SEN; LEE; MCPHERSON, 1979).

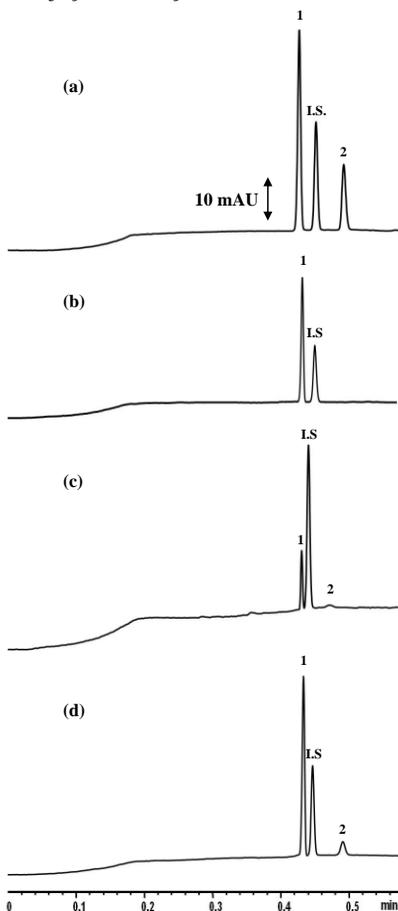
Com o objetivo de ajustar o pH de extração e torná-lo alcalino, o tampão TBS na concentração de 5 % (m/v) foi adicionado. Nesta condição de pH a eficiência da extração é aumentada e são extraídos tanto nitrito livre quanto nitrito ligado às proteínas. A extração em condições alcalinas é recomendada especialmente para amostras naturalmente ácidas, como, embutidos fermentados, pois em pH menor que 5, o nitrito pode reagir com outros compostos presentes nas amostras como aminas, aminoácidos e antioxidantes, o que resultaria em perdas na quantificação por reações formadas durante a extração (FIDLER; FOX, 1978; FOX; DOERR; LAKRITZ, 1982; MOORCROFT; DAVIS; COMPTON, 2001; SEN; LEE; MCPHERSON, 1979; USHER; TELLING, 1975)

Por meio de avaliações preliminares verificou-se que os reagentes Carrez I e II não foram necessários para a extração dos analitos. Nenhuma etapa adicional de desproteínização ou remoção da gordura foi necessária,

e estes compostos não interferiram no método desenvolvido nas condições estudadas.

Na Figura 17 são apresentados os eletroferogramas em solução padrão e amostras de produtos cárneos obtidos pela aplicação do método proposto.

Figura 17 - Eletroferograma da separação dos analitos em (a) solução padrão, (b) salame tipo italiano e (c) carne suína salgada, (d) mortadela. Onde: (1) nitrato, (I.S.) tiocianato, (2) nitrito. Condições de separação: capilar 48,5 cm (8,5 cm \times 75 μ m d.i. \times 375 μ m d.e.). BGE: 20 mmol L⁻¹ de ácido perclórico e 65 mmol L⁻¹ de β -alanina, pH 3,83, injeção hidrodinâmica (-50 mbar/ 4 s), -30 kV, polaridade negativa na injeção, detecção direta a 210 nm



Fonte: o próprio autor.

A partir da Figura 17 é possível constatar que os analitos foram separados com eficiência e resolução adequados. O elevado teor de sal de amostras como costela, salame e carne salgada poderia ocasionar um aumento da força iônica e por consequência problemas de separação e resolução, para estas amostras foram aplicadas mais diluições que as demais, e ao fim os eletroferogramas apresentam perfil similar ao da solução padrão e de amostras menos complexas.

3.3 ADEQUAÇÃO DO MÉTODO POR CZE E DOS MÉTODOS CLÁSSICOS AOS PRINCÍPIOS DA QUÍMICA VERDE

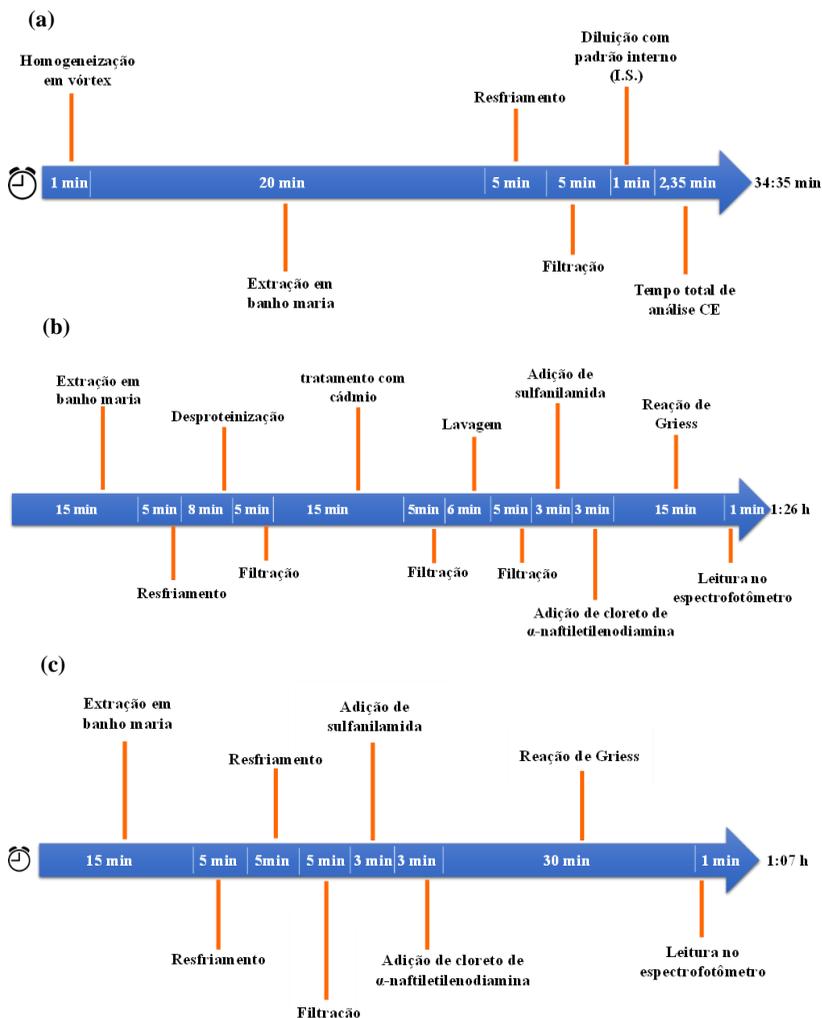
A critério de comparação, o método por CZE proposto neste estudo e os métodos clássicos recomendados pelo MAPA para determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos foram avaliados quanto ao: tempo de análise, geração de resíduos e Eco-escala.

A fim de comparar o tempo de análise durante as diferentes etapas do procedimento analítico (extração dos analitos e análise) foram construídas linhas do tempo estimado para as determinações utilizando o método proposto por CZE (Figura 18 a) e os métodos para nitrato (Figura 18 b) e nitrito (Figura 18 c) recomendados pelo Mapa.

Para cada etapa foi feita uma estimativa de tempo com base em procedimentos experimentais e o tempo total foi calculado para a análise. O tempo de execução pode variar de acordo com a experiência do analista, com a amostra a ser filtrada.

O tempo gasto na etapa de pesagem da amostra foi desconsiderado uma vez que é similar em ambos os procedimentos. Tanto nos métodos espectrofotométricos, quanto no método por CZE foi desconsiderado o tempo gasto no preparo da curva de calibração. Para a análise utilizando CZE também não foi considerado o tempo gasto nos condicionamentos do capilar no início e fim do dia.

Figura 18 – Estimativa do tempo de execução por amostra para determinação de (a) nitrato e nitrito por CZE (b) íon nitrato e (c) íon nitrito em produtos cárneos utilizando o método espectrométrico recomendado pelo Mapa



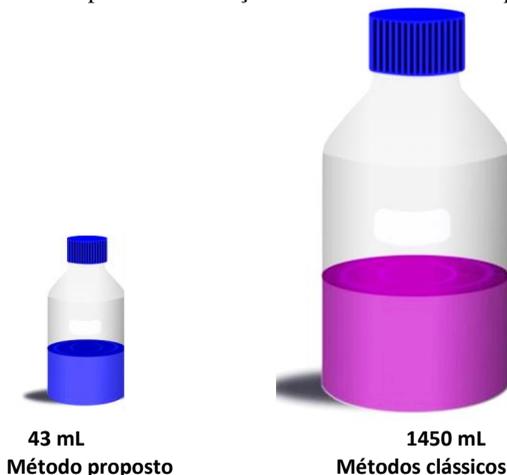
Fonte: o próprio autor.

A partir da Figura 18 é possível verificar a expressiva diferença nos tempos de análise pelo método proposto por CZE e dos métodos clássicos para determinação de nitrato e nitrito. Sendo que o tempo de

análise utilizando os métodos clássicos é superior a 1 hora para cada analito, enquanto que utilizando o método por CZE é possível determinar ambos os analitos em menos de 35 minutos. É possível verificar ainda que em todos os procedimentos analíticos avaliados o preparo da amostra foi a etapa com maior contribuição para o tempo de análise.

Uma estimativa do volume de geração de resíduos dos métodos proposto e recomendado pelo Mapa é apresentada na Figura 19.

Figura 19 - Estimativa do volume de resíduos gerados pelo método por CZE e dos métodos clássicos para determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos



Fonte: o próprio autor.

A Figura 19 ilustra a expressiva diferença no volume de geração de resíduos dos métodos avaliados, sendo que o método por CZE proposto neste estudo apresenta aproximadamente 32 vezes menos geração de resíduos que os métodos clássicos para determinação de nitrato e nitrito. Dos 45 mL de resíduo resultantes do método por CZE, cerca de 21 mL são resultantes da construção da curva de calibração em triplicata de preparo, 20 mL por amostra são utilizados para extração dos analitos e cerca de 4 mL de BGE são utilizados ao longo de um dia de análise.

A construção da curva de calibração para a quantificação de nitrato e nitrito pelo método clássico contribuiu de forma importante para o elevado volume de resíduo gerado, uma vez que sua construção é recomendada em sete níveis de concentração, utilizando balões de 50 mL para cada ponto da curva. Logo, ao se considerar a construção da curva em no mínimo duplicata e a elaboração de um “branco”, totalizamos um

volume de resíduos equivalente a 750 mL. O volume de resíduos excedente advém das etapas de extração (cerca de 250 mL por amostra) e reação de Griess (50 mL).

A fim de comparar a adequação dos métodos em relação a química verde, os mesmos foram avaliados segundo suas Eco-escalas, como mostram as Tabelas 7, 8, e 9.

Tabela 7 - Eco-escala para o método por CZE para determinação simultânea de nitrato e nitrito por amostra

Eco-escala				
Reagentes	Quantidade	Pictogramas de risco	Risco	Penalização
B-alanina	1	0	0	0
Ácido perclórico	1	4	2	8
Nitrato de sódio	1	2	1	2
Nitrito de sódio	1	3	2	6
Tiocianato de potássio	1	1	1	1
Tetraborato de sódio	1	2	1	2
Hidróxido de sódio	1	1	1	1
Total reagentes				20
Consumo de energia	Quantidade		Penalização	
Balança analítica	<0,1 kW/h		0	
Vórtex	<0,1 kW/h		0	
Banho-maria	<0,1 kW/h		0	
CE	<0,1 kW/h		0	
Risco ocupacional	Risco		Penalização	
	1		1	
Resíduos	Quantidade	Risco	Penalização	
	5	1	5	
Total de penalizações				26
Eco-escala				74

Fonte: o próprio autor.

Tabela 8 - Eco-escala para o método clássico recomendado pelo Mapa para a determinação de nitrato por amostra

Eco-escala				
Reagentes	Quantidade	Pictogramas de risco	Risco	Penalização
Tetraborato de sódio	1	2	1	2
Ferrocianeto de potássio	1	1	1	1
Sulfato de zinco	1	2	2	4
Sulfanilamida	1	1	1	1
Cloreto de α -natilenodiamina	1	1	1	1
Tampão pH 9,6	1	1	1	1
Cadmio esponjoso	2	3	2	12
Total reagentes				22
Consumo de energia	Quantidade		Penalização	
Balança analítica	<0,1 kW/h		0	
Banho-maria	<0,1 kW/h		0	
Espectrofotômetro	<0,1 kW/h		0	
Risco ocupacional	Risco		Penalização	
	3		3	
Resíduos	Quantidade	Risco	Penalização	
	5	1	5	
Total de penalizações				30
Eco-escala				70

Fonte: o próprio autor.

Tabela 9 - Eco-escala para o método clássico recomendado pelo Mapa para a determinação de nitrito

Eco-escala				
Reagentes	Quantidade	Pictogramas de risco	Risco	Penalização
Tetraborato de sódio	1	2	1	2
Ferrocianeto de potássio	1	1	1	1
Sulfato de zinco	1	2	2	4
Sulfanilamida	1	1	1	1
Cloreto de α -natenodiamina	1	1	1	1
Nitrito de sódio	2	3	2	12
Total reagentes				21

Consumo de energia	Quantidade	Penalização
Balança analítica	<0,1 kW/h	0
Banho-maria	<0,1 kW/h	0
Espectrofotômetro	<0,1 kW/h	0

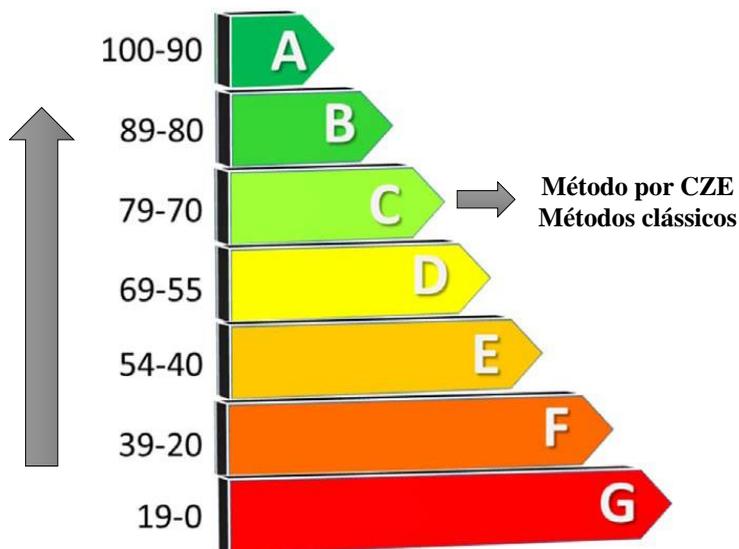
Risco ocupacional	Risco	Penalização
	3	3

Resíduos	Quantidade	Risco	Penalização
	5	1	5
Total de penalizações			29
Eco-escala			71

Fonte: o próprio autor.

Para elaboração da eco-escala todos os aspectos referentes às etapas de execução do método foram considerados, incluindo o preparo de amostras e das curvas de calibração. A partir das tabelas acima verificou-se que os três métodos obtiveram pontuação inferior a 75 e superior a 50 pontos, portanto, são considerados adequados à química verde, de acordo com a classificação proposta por GALUSZKA, A. et al. (2012). A adequação à química verde dos métodos previamente descritos é ilustrada na Figura 20.

Figura 20 – Adequação à química verde dos métodos por CZE e recomendados pelo Mapa segundo a Eco-escala



Adequação a química verde

Fonte: o próprio autor.

A toxicidade dos analitos, especialmente o nitrito e a inflamabilidade do ácido perclórico, componente do BGE contribuíram para as altas penalizações recebidas pelos reagentes no método por CZE. Mesmo que utilizados de forma diluída e em volumes menores que 5 mL, a penalização é elevada pela multiplicação do número de pictogramas (3 para o nitrito e 4 para o ácido perclórico) por 2 devido ao reagente ser considerado perigoso.

A Eco-escala considera três faixas de consumo de reagentes para definir as penalizações. A menor penalização é 1 quando utilizado volumes de reagente inferior a 10 mL, a segunda penalização é 2 para volumes de reagente entre 10 e 100 mL, enquanto que volumes maiores que 100 mL recebem 3 pontos de penalização. Se um método utiliza 1 mL de reagente, ele recebe a mesma penalização de um método que utiliza 9 mL, apesar da grande diferença de volume. Assim, a amplitude dessa faixa deveria ser revista a fim de melhor atribuir os pontos de penalização para o parâmetro consumo de reagentes.

Em todos os métodos avaliados o consumo de energia foi menor que 0,1 kW/h e portanto não receberam penalizações. O risco ocupacional do método por CZE foi considerado baixo, pois desde que sejam seguidos todos os procedimentos de manejo e boas práticas laboratoriais, não há grandes riscos ao analista. Por outro lado, a devido a utilização de cádmio no método clássico para determinação de nitrato, um maior risco ocupacional está implícito a esta determinação, por isso o mesmo recebeu uma penalização maior que o método por CZE.

Um aspecto da Eco-escala que pode ser aperfeiçoado está relacionado a contabilização dos resíduos gerados. Quando um método resulta em um volume de resíduos superior a 10 mL é aplicada a penalização máxima de 5 pontos, independente do volume. Dessa forma, a Eco-escala não prevê, por exemplo, a diferenciação entre os volumes resultantes do método por CZE (45 mL) e dos métodos clássicos (1450 mL), e portanto ambos recebem a penalização máxima, e obtiveram consequentemente a mesma classificação como adequados a química verde, o que em termos práticos não é verídico.

Até o presente momento não foram encontrados na literatura científica trabalhos utilizando a Eco-escala para avaliar a adequação à química verde de métodos por eletroforese capilar. Sendo este o primeiro trabalho a utilizar este procedimento de avaliação de um método por eletroforese capilar aplicado à análise de alimentos.

Alguns trabalhos utilizando a Eco-escala podem ser encontrados na literatura porém sua aplicação está concentrada principalmente em amostras de fármacos e amostras ambientais.

Para avaliar a adequação de um método de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem* de para determinação de alquilfenóis em amostras de sedimentos Salgueiro-González et al. (2015) utilizaram a Eco-escala. Os autores apresentaram de forma detalhada todos os reagentes utilizados, quantidade de energia consumida por cada equipamento utilizados, bem como os volumes de resíduo gerado em cada etapa da determinação, e ao final obtiveram uma Eco-escala de 76, sendo o método considerado excelente para a química verde.

Yehia e Mohamed (2016) avaliaram a adequação à química verde de um método de HPLC para a determinação de fenilefrina, paracetamol e guaifenesina em medicamentos utilizando a Eco-escala. Segundo os autores a Eco-escala obtida foi 86, ou seja excelente para a química verde. Contudo avaliando os pontos de penalização apontados pelos autores é possível verificar que na seção dos reagentes foram contabilizados somente os constituintes da fase móvel, negligenciando a utilização dos padrões dos fármacos, os quais apresentam pictogramas de risco e

segundo sua ficha de segurança requerem atenção. Assim ao desconsiderá-los o autor está subestimando a real Eco-escala do método.

Na maioria dos trabalhos encontrados na literatura os autores não apresentam uma descrição detalhada dos parâmetros avaliados na Eco-escala, reportando na maioria dos casos apenas o resultado final obtido após o cálculo dos pontos de penalização, não sendo possível assim verificar a veracidade do resultado publicado.

De maneira geral a Eco-escala é uma ferramenta importante para calcular a adequação de um método analítico aos princípios da química verde de forma quantitativa e objetiva, eliminando assim classificações baseadas em suposições e alegações empíricas. Contudo a escala deve ser aperfeiçoada de forma a melhor classificar as penalizações relacionadas ao volume de reagentes consumidos e o volume de resíduos gerado, diminuindo o intervalo entre as penalizações para o consumo de reagentes e contemplando uma faixa maior para o volume de resíduos, que atualmente a penalização máxima é acima de 10 mL, independente do volume gerado.

3.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

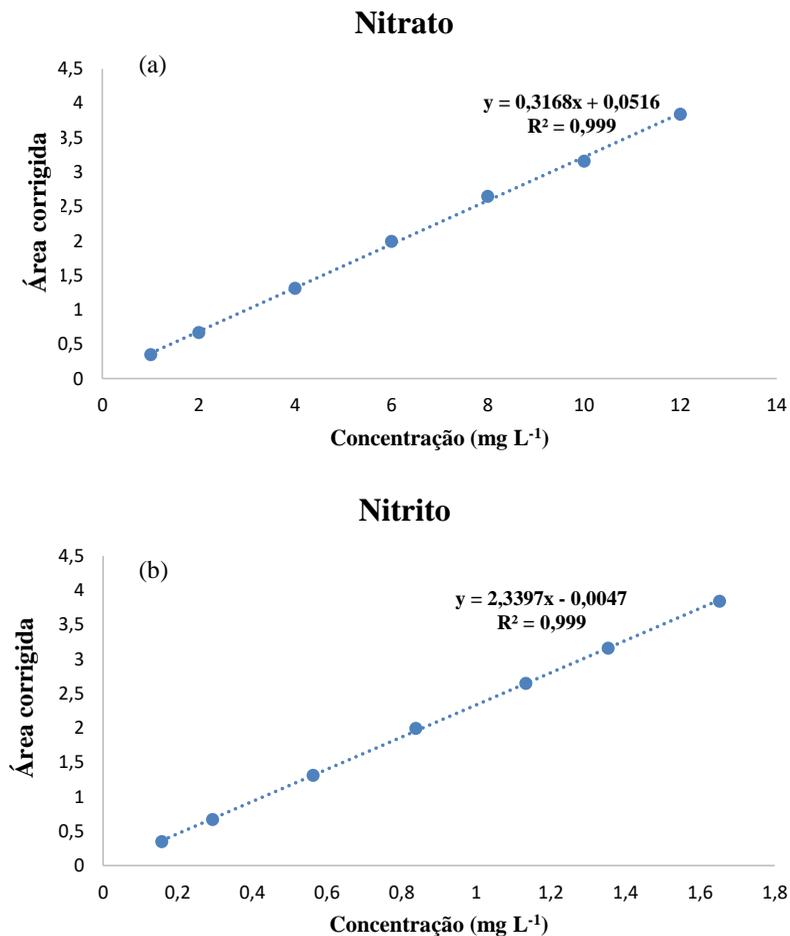
3.4.1 Conformidade do sistema

Os valores de CV obtidos para o parâmetro tempo de migração corrigida foram 0,11 % para o íon nitrato e 0,08 % para o íon nitrito. Para o parâmetro área corrigida foram obtidos CV de 0,39 % para o nitrato e 0,54 % para o nitrito. Os baixos coeficientes de variação encontrados demonstram que o equipamento de CE empregado para as análises foi adequado para o uso nos procedimentos de análise e validação propostos.

3.4.2 Linearidade

A partir dos dados obtidos experimentalmente foram construídas as curvas de concentração *versus* área corrigida para os íons nitrato e nitrito em solução aquosa e em matriz de cada uma das cinco classes de produtos cárneos. Todas as curvas apresentaram coeficiente de determinação (R^2) maior ou igual a 0,99. As curvas de calibração dos analitos em solução aquosa são apresentadas na Figura 21.

Figura 21 - Curva de calibração dos analitos em solução aquosa. (a) nitrato, (b) nitrito



Fonte: o próprio autor.

Após a construção dos gráficos das curvas de calibração, realizou-se a regressão linear e inspeção dos gráficos de resíduos da regressão, os possíveis *outliers* foram avaliados utilizando o teste de Grubbs (GRUBBS, 1969), mas nenhum *outlier* foi confirmado, logo nenhum dado foi removido.

As premissas de normalidade, homoscedasticidade, independência dos resíduos e ajuste ao modelo linear do MMQO foram confirmadas,

comprovando a linearidade da faixa de trabalho testada para as curvas de ambos os analitos em ambas as curvas.

3.4.3 Efeito de matriz

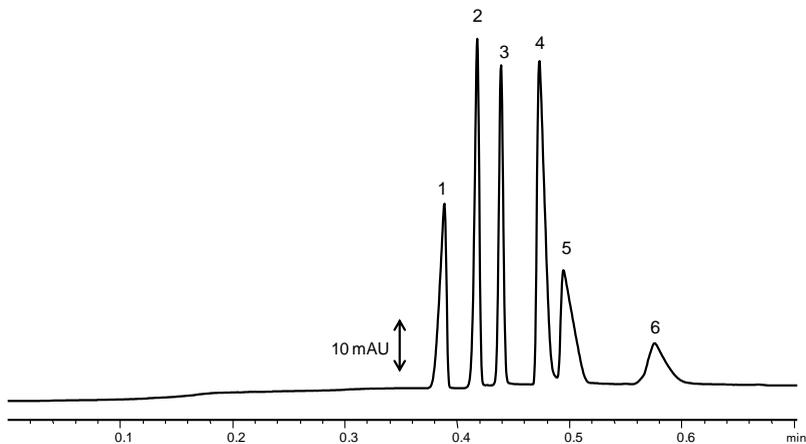
A partir dos resultados obtidos verificou-se que a amostra de salame tipo italiano apresentou efeito de matriz para o íon nitrato, enquanto que a amostra de carne suína salgada *in natura* apresentou efeito de matriz para ambos os analitos (dados não mostrados). Assim, ambas as amostras foram quantificadas utilizando curvas preparadas em matriz, enquanto que as demais amostras sem efeito foram quantificadas utilizando a curva de calibração em solução aquosa.

3.4.4 Seletividade

Os produtos cárneos são amostras complexas e podem apresentar diversas espécies iônicas ou ionizáveis que podem ser extraídas junto com os analitos e possivelmente interferir na separação analítica. Contudo, alguns destes compostos tais como fosfatos, sulfatos não apresentam absorvidade molar no comprimento de onda de avaliação dos analitos, enquanto que outros compostos que apresentam absorvidade não apresentam mobilidade similar (ácido sórbico, sorbato de potássio, ácido ascórbico e ascorbato) a dos analitos e, portanto não atuam como interferentes.

A Figura 22 apresenta um eletroferograma experimental da injeção dos analitos na presença de três possíveis interferentes: bromato, brometo e oxalato.

Figura 22 - Eletroferograma experimental da seletividade. Onde: brometo (1), nitrato (2), tiocianato (3), nitrito (4), bromato (5), oxalato (6). Condições de separação: capilar de 48,5 cm (8,5 cm \times 75 μ m d.i. \times 375 μ m d.e.). BGE: 20 mmol L⁻¹ de ácido perclórico e 65 mmol L⁻¹ de β -alanina, pH 3,83, injeção hidrodinâmica (-50 mbar/ 4 s), -30 kV, polaridade negativa na extremidade da injeção, detecção direta a 210 nm



Fonte: o próprio autor.

A partir do eletroferograma obtido foi possível observar que o método foi capaz de separar todos os ânions com suficiente resolução, confirmando a seletividade do método na condição de separação avaliada e na presença dos potenciais interferentes.

3.4.5 Precisão

Os CV obtidos de repetibilidade para o parâmetro tempo de migração corrigido foram menores que 0,15% para ambos os analitos. Em relação ao parâmetro área corrigida, os valores variaram de 1,16 a 2,86 % para o nitrato e 2,05 % a 4,57% para o nitrito.

Os resultados de precisão intermediária (precisão inter-ensaio) para o parâmetro tempo de migração corrigido variaram de 1,32 % a 1,66 % para o nitrato e de 0,21 % a 0,39 % para o nitrito, enquanto que para a área corrigida os valores variaram de 1,74 % a 5,15 % para nitrato e de 1,76 % a 5,29 % para o nitrito. Estes resultados de precisão são considerados aceitáveis, segundo a AOAC International (2012), que estabelece 5,3 % como precisão aceitável para analitos presentes em concentrações de até 100 mg kg⁻¹.

3.4.6 Exatidão

Os resultados de recuperação aparente para as amostras analisadas são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados médios de recuperação aparente em amostras de produtos cárneos.

Amostra	% NO₃⁻	% NO₂⁻
Linguiça de pernil	90,6 – 105	85,0 – 101
Salame tipo italiano	83,5 – 86,5	97,5 – 101
Salsicha	92,3 – 106	89,0 – 101
Carne suína salgada <i>in natura</i>	102 – 107	87,7 – 106
Costela suína salgada defumada	90,2 – 103	85,3 – 107

* n=3.

Fonte: o próprio autor.

A recuperação aparente dos analitos variou de 83,5 a 107% para o íon nitrato e de 85 a 107% para o íon nitrito. A AOAC apresenta os valores considerados aceitáveis para a recuperação de acordo com a faixa de concentração dos analitos. Para analitos presentes nas amostras em concentrações de até 100 mg kg⁻¹ recomenda-se que os valores de recuperação estejam entre 90-107 % e de 95-105 % para analitos em até 1000 mg kg⁻¹ (AOAC INTERNATIONAL, 2012). Considerando os limites estabelecidos pela legislação brasileira (300 e 150 mg kg⁻¹ para nitrato e nitrito, respectivamente) alguns valores divergem da recomendação da AOAC, contudo visto a complexidade das amostras de produtos cárneos, pode-se dizer que os resultados são aceitáveis.

3.4.7 LOD e LOQ

Para o íon nitrato os resultados de LOD e LOQ obtidos foram 0,10 mg kg⁻¹ e 0,31 mg kg⁻¹, respectivamente. Enquanto que os valores de LOD e LOQ para o íon nitrito foram 0,31 mg kg⁻¹ e 1,25 mg kg⁻¹, respectivamente. Resultados adequados com base na sensibilidade requerida para os níveis permitidos pela legislação dos analitos nas amostras de produtos cárneos, 300 e 150 mg kg⁻¹, para nitrato e nitrito respectivamente (BRASIL, 2006).

3.4.8 Robustez

Os resultados de robustez obtidos a partir do teste de Youden para o íon nitrato são apresentados na Tabela 11 e para o íon nitrito na Tabela 13.

Tabela 11 - Efeito da variação dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o íon nitrato.

Parâmetro	Área corrigida	Tempo de migração corrigido	Concentração (mg L ⁻¹)	Simetria	Resolução
Tensão	2,220 – 2,286 = -0,066	0,953 – 0,958= -0,005	6,148 – 6,352= -0,204	0,975 – 0,995= -0,020	1,090 – 1,244= -0,154
pH	2,176 – 2,330 = -0,154	0,954 – 0,958 = -0,004	6,013 – 6,486= -0,473	0,968 – 1,002= -0,034	1,039 – 1,295= -0,256
Temperatura	2,287 – 2,219= 0,068	0,955 – 0,956= -0,001	6,354 – 6,146= 0,209	0,991 – 1,022= -0,032	1,201 – 1,133= 0,068
Pressão	2,267 – 2,238= 0,029	0,953 – 0,958= -0,005	6,294 – 6,206= 0,088	0,983 – 0,987= -0,004	1,115 – 1,219= -0,104
Comp. De onda	2,289 – 2,219= 0,070	0,955 – 0,956= -0,001	6,354 – 6,146= 0,209	0,991 – 0,979= 0,012	1,201 – 1,133= 0,068
Tempo de lavagem	2,263 – 2,242= 0,021	0,965 – 0,955= 0,001	6,282 – 6,217= 0,066	0,994 – 0,976= 0,018	1,152 – 1,181= -0,029
Tempo de injeção	2,245 – 2,260= -0,015	0,956 – 0,956= 0,000	6,226 – 6,274= -0,047	0,991 – 0,979= 0,012	1,213 – 1,212= 0,092

Fonte: o próprio autor.

Tabela 12 - Efeito da variação dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o íon nítrito.

Parâmetro	Área corrigida	Tempo de migração corrigido	Concentração (mg L ⁻¹)	Simetria	Resolução
Tensão	0,923 – 0,888= 0,035	1,100 – 1,092= 0,008	3,247 – 3,116= 0,131	0,767 – 0,809= -0,042	2,081 – 2,416= -0,336
pH	0,912 – 0,899= 0,012	1,085 – 1,106= -0,021	3,169 – 3,158= 0,010	0,794 – 0,784= 0,011	1,778 – 2,719= -0,940
Temperatura	0,910 – 0,901= 0,009	1,098 – 1,094= 0,003	3,198 – 3,164= 0,034	0,784 – 0,792= -0,008	2,307 – 2,190= 0,116
Pressão	0,092 – 0,908= -0,006	1,100 – 1,092= 0,009	3,170 – 3,193= -0,023	0,785 – 0,791= -0,006	2,146 – 2,351= -0,205
Comp. De onda	0,910 – 0,901= 0,009	1,098 – 1,094= 0,003	3,198 – 3,164= 0,034	0,784 – 0,792= -0,008	2,307 – 2,190= 0,116
Tempo de lavagem	0,909 – 0,902= 0,007	1,096 – 1,096= 0,000	3,194 – 3,169= 0,026	0,782 – 0,794= -0,012	2,256 – 2,241= 0,015
Tempo de injeção	0,917 – 0,894= 0,022	1,097 – 1,096= 0,001	3,223 – 3,140= 0,083	0,801 – 0,776= 0,026	2,375 – 2,123= 0,252

Fonte: o próprio autor.

A partir dos resultados apresentados nas tabelas acima, é possível concluir que o método proposto demonstrou ser robusto para ambos os analitos, uma vez que nenhuma das variações dos parâmetros analíticos resultou em efeitos significativos nos parâmetros avaliados.

3.4.9 Incerteza de medição

Os valores obtidos para a incerteza de medição foram 5,36 % para o nitrato e 5,63 % para o nitrito. Como esperado, os principais fatores que contribuíram para a incerteza foram a repetibilidade (precisão intra-ensaio) e a precisão intermediária (precisão inter-ensaio), uma vez que estes parâmetros incluem erros aleatórios de muitas fontes incluindo erros do analista. As demais fontes avaliadas tiveram menores contribuições para os valores de incerteza.

Os resultados obtidos são adequados, ficando próximos aos valores da precisão do método, e reiteram a confiabilidade do método para a determinação dos íons nitrato e nitrito em amostras de produtos cárneos.

A determinação dos íons nitrato e nitrito em produtos cárneos não possui análise de contraprova, o que reforça ainda mais a necessidade de métodos que forneçam dados confiáveis, os quais serão utilizados para a tomada de decisão entre aceitar ou condenar um lote de produto.

3.4.10 Ensaio de proficiência

O teste de proficiência confirmou que o método proposto neste estudo é adequado para a determinação de nitrito ($z = 1,9$), enquanto que o resultado obtido para nitrato foi considerado questionável, uma vez que o z -score obtido foi 2,3.

No teste de proficiência somente 50% dos resultados obtidos foram considerados satisfatórios para determinação de nitrato, enquanto que 63% dos resultados foram considerados satisfatórios para nitrito.

Majoritariamente os laboratórios participantes utilizaram os métodos clássicos propostos pelo Mapa (BRASIL, 1999) e ISO (ISO, 1975a,b), assim o resultado questionável obtido para o nitrato pode ser atribuído às diferenças nos preparos de amostras utilizados nas etapas de extração, redução do nitrato com cádmio e desproteínização. Entre as etapas mencionadas, a redução do nitrato utilizando coluna de cádmio pode ser considerada uma das principais fontes de imprecisão do método, podendo influenciar diretamente o resultado obtido pelos demais laboratórios no teste de proficiência.

No preparo de amostras proposto neste estudo não foi empregado nenhum reagente específico para desproteïnização, apenas a associação de pH alcalino e temperatura de extração. Aproximadamente 90% dos demais participantes realizaram desproteïnização com Carrez I e II, cuja eficiência tem sido questionada por Rincón, Martínez e Delgado (2003) e Rincón et al. (2008). De acordo com os autores o reagente Carrez II não atua de forma eficiente na desproteïnização, enquanto que o reagente Carrez I pode resultar em perdas de quantificação por precipitar o nitrito ligado as proteínas, e por isso recomenda que sua utilização seja evitada.

3.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após validado, o método de SEI-CZE foi aplicado para quantificar os íons nitrato e nitrito em amostras de produtos cárneos. Os resultados da quantificação são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Quantificação dos íons nitrato e nitrito em produtos cárneos.

Amostra	Inspeção sanitária	NaNO₃ (mg kg⁻¹)	NaNO₂ (mg kg⁻¹)	NaNO₂ Residual (mg kg⁻¹)
Linguiça toscana	SIF	118 ± 4,2	45,0 ± 1,4	141
Linguiça de pernil suíno	SIF	94,3 ± 4,7	15,6 ± 2,5	92,3
Salame tipo Italiano A	SIF	65,6 ± 3,3	29,2 ± 4,9	82,5
Salame tipo Italiano B	SIF	173 ± 4,8	<LOQ	142
Copa	SIF	88,3 ± 3,0	<LOQ	71,7
Salame colonial	SIE	122 ± 4,2	<LOQ	99,3
Salsicha	SIF	115 ± 4,6	15,6 ± 2,5	109
Mortadela	SIE	161 ± 2,5	20,8 ± 1,0	152
Presunto	SIE	129 ± 4,1	10,2 ± 0,1	115
Carne salgada de bovino	SIF	77 ± 4,9	<LOQ	62,7
Carne salgada de suíno <i>in natura</i>	SIE	68,1 ± 4,1	13,2 ± 1,2	68,6
Costela de suíno salgada defumada	SIE	95,6 ± 4,1	127 ± 4,8	205
Lombo defumado	SIE	58,2 ± 4,7	8,4 ± 1,0	55,7

Fonte: o próprio autor.

Das treze amostras de produtos cárneos analisadas, quatro apresentaram concentração de nitrito menor que o LOQ. Com exceção da amostra de costela suína salgada defumada, todas as demais amostras apresentaram-se de acordo com os limites preconizados pela legislação brasileira para nitrato e nitrito (150 e 300 mg kg^{-1} , respectivamente) e nitrito residual (150 mg kg^{-1}) (BRASIL, 2006). Apesar de apresentar teor de nitrito residual de 152 mg kg^{-1} , a amostra de mortadela foi considerada adequada devido à incerteza do método ser em média 5%.

Todas as amostras produzidas sob inspeção federal apresentaram concentrações de nitrato e nitrito de acordo com a legislação brasileira, enquanto que das amostras com inspeção estadual, uma apresentou limites acima do estabelecido pela legislação e outra estaria muito próxima ao limite para reprovação. Servindo de alerta para a necessidade de maior fiscalização das amostras produzidas sob este selo.

Outros autores também estimaram o conteúdo de nitrato e nitrito em produtos cárneos comercializados no Brasil e obtiveram resultados similares. Pereira, Petrucci e Cardoso (2012) determinaram por CZE nitrato e nitrito em amostras de linguiça, mortadela, presunto, bacon e salame. O método proposto pelos autores apresentou tempo de separação de 4 min, e com preparo de amostras superior a 1 hora. Em alguns produtos cárneos os níveis de nitrato e nitrito foram menores que o LOQ, uma amostra (presunto) apresentou concentração de nitrito residual acima de 150 mg kg^{-1} enquanto que os demais produtos avaliados atenderam os limites estabelecidos pela legislação.

Andrade e colaboradores (2003) determinaram nitrato e nitrito em amostras de salsicha e linguiça por meio de um método de análise utilizando injeção em fluxo, e as concentrações encontradas em todas as amostras estavam de acordo com os limites estabelecidos pelo Mapa para estes aditivos.

Os produtos cárneos são alimentos amplamente consumidos pela população brasileira. A partir dos resultados obtidos neste trabalho reforça-se a necessidade de maior controle de qualidade pelas indústrias e rigorosa fiscalização pelos órgãos reguladores, a fim de garantir o cumprimento das legislações e a segurança dos consumidores.

4 CONCLUSÕES

A modificação do método proposto por Della Betta et al. (2014) mostrou-se adequada para determinação de nitrato e nitrito em amostras de produtos cárneos. Além de apresentar diversas vantagens em relação aos métodos recomendados por órgãos oficiais, e até mesmo em relação a outros métodos por CE, principalmente por sua simplicidade de execução e curto tempo de análise (30 s).

O preparo de amostra desenvolvido mostrou ser adequado para a extração dos analitos nas amostras de produtos cárneos, de simples execução, não requer nenhum equipamento sofisticado, apresenta baixo consumo de reagentes e resulta em baixa geração de resíduos, características essas requeridas em laboratórios de rotina com grandes demandas de análise.

Quando comparado com os métodos para determinação de nitrato e nitrito recomendados pelo Mapa o método proposto mostrou ser mais rápido, resulta na geração de 32 vezes menos resíduos que os métodos clássicos, além de ser adequado à química verde segundo o resultado obtido na Eco-escala.

O método modificado foi validado seguindo o protocolo de validação analítica da Eurachem. Os parâmetros avaliados foram linearidade, efeito de matriz, seletividade, precisão, exatidão, LOD, LOQ, robustez e medida de incerteza apresentando resultados adequados em todos os parâmetros avaliados.

Quando aplicado em amostras de produtos cárneos, o método de separação apresentou resolução satisfatória, mesmo em amostras com elevado teor de sal, enfatizando sua versatilidade na determinação dos íons nitrato e nitrito em diferentes tipos de amostras com características distintas. Exceto por uma, todas as amostras apresentaram concentração de nitrato e nitrito em concordância com os parâmetros exigidos pela legislação brasileira.

Os resultados obtidos reforçam a necessidade de constante monitoramento desses aditivos em amostras de produtos cárneos utilizando métodos analíticos rápidos e que forneçam resultados confiáveis de forma a garantir o cumprimento das legislações.

**CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM
MÉTODO RÁPIDO POR CZE PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE BROMATO, BROMETO, NITRATO E
NITRITO EM CERVEJAS**

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO RÁPIDO POR CZE PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE BROMATO, BROMETO, NITRATO E NITRITO EM CERVEJAS

RESUMO

Neste capítulo é apresentado o desenvolvimento e validação de um método rápido utilizando CZE para a determinação simultânea dos íons bromato, brometo, nitrato e nitrito em cervejas. Sendo este o primeiro relato da determinação simultânea destes analitos, e de sua aplicação nas amostras avaliadas. Com o objetivo de reduzir o tempo total de análise algumas estratégias foram avaliadas, e a estratégia escolhida foi a associação entre injeção pela extremidade mais próxima ao detector e injeções múltiplas (SEI-MI), que resultou na separação de duas amostras em um tempo de separação de apenas 26 s e tempo total de análise de 2,3 min, permitindo assim analisar cerca de 52 amostras/h. As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida de 32 cm de comprimento total, sendo 8,5 cm o comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno, utilizando injeção hidrodinâmica e detecção direta a 200 nm. O eletrólito de corrida foi composto por 10 mmol L^{-1} ácido perclórico e 40 mmol L^{-1} de β -alanina, pH 3,96. Tiocianato foi utilizado como padrão interno na concentração final de 25 mg L^{-1} . O método foi avaliado quanto à adequação aos princípios da química verde utilizando a Eco-escala, na qual resultou ser adequado à química verde, sendo esta aplicação inédita na análise de alimentos utilizando eletroforese capilar. O método foi validado segundo o protocolo de validação da Eurachem, e sua adequação para o uso confirmada para aplicação na determinação dos analitos em vinte amostras de cervejas de diferentes variedades e fabricantes. As concentrações dos íons bromato, brometo e nitrito foram menores que o LOD em todas as amostras, enquanto que o íon nitrato foi quantificado em todas as amostras avaliadas, sendo as cervejas do tipo Ale as que apresentaram maiores concentrações. Devido as características de química verde, curto tempo de separação e alta frequência analítica o método proposto pode ser uma ferramenta útil para a avaliação da qualidade de cervejas em indústrias e órgãos de fiscalização.

Palavras-chave: Método rápido; bebidas alcoólicas; avaliação da qualidade; validação analítica; química verde.

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas e apreciadas do mundo e sua composição apresenta grande variabilidade, existindo especificações para mais de 187 variedades. O produto apresenta variações no sabor e na composição, conforme os ingredientes empregados e o processo de produção.

O segmento cervejeiro possui grande representatividade econômica, sendo considerado um dos mais expressivos da economia brasileira. Sua cadeia produtiva é responsável por cerca de 2% do PIB, com crescimento em média de 5 % ao ano e geração de mais de 2,7 milhões de empregos. Em 2006 o Brasil era o quinto maior produtor mundial de cerveja, mas dados de 2014 apontam o país em terceiro lugar no ranking. Apesar de ser um dos principais produtores mundiais, o Brasil é apenas o 26º maior consumidor mundial de cerveja com consumo *per capita* anual de 68,3 L, bem abaixo do consumo de outros países como República Tcheca (148,6 L) e Áustria (107,8 L) (CERVBRASIL, 2016; OETTERER, 2006; VENTURINI FILHO, 2011).

Os principais ingredientes utilizados na elaboração de cervejas são água, malte, lúpulo, levedura e adjuntos (BRASIL, 2001). Para conferir características específicas ao produto podem ser adicionados outros tipos de ingredientes, como por exemplo, frutas, mel, especiarias, entre outros (BUGLASS, 2011).

A existência de diferentes variedades de cerveja é resultado da utilização de diferentes ingredientes, condições de processamento, bem como aspectos culturais (PRIEST; STEWART, 2006).

Os ingredientes básicos utilizados em uma formulação de cerveja podem apresentar características distintas conforme sua obtenção (origem, solo, clima, processamento empregado, etc), mas também serem utilizados em diferentes proporções para obtenção de produtos com características diferenciadas.

A água é a matéria-prima presente em maior quantidade na cerveja, e deve ser potável e apresentar composição química adequada, uma vez que reflete diretamente na qualidade do produto final (PRIEST; STEWART, 2006). Para fabricação de cerveja é preferível que a água seja levemente dura e não alcalina, e quando fora dos padrões deve ser corrigida. Os sais solúveis como bicarbonato, cloreto, sulfato de sódio, cálcio e magnésio afetam o aroma e a cor da bebida (OETTERER, 2006). Os constituintes inorgânicos majoritários da água são cálcio, magnésio, sódio, sulfato, cloretos, bicarbonatos e nitratos, mas outros compostos

como potássio, ferro, manganês, cobre e brometo podem estar presentes em menor concentração.

O malte é o produto resultante da germinação da cevada sob condições controladas. Diferentes tipos de malte podem ser utilizados. Cada qual apresenta características próprias, que resultam em produtos com diferentes características de cor, sabor e teor alcoólico. Desta forma, a escolha, a quantidade e a combinação de tipos de malte contribuíram para a origem de diferentes variedades de cerveja (PRIEST; STEWART, 2006).

A cevada pode ser substituída por adjuntos, que são carboidratos de outras fontes vegetais, principalmente amido, que devido a ação enzimática é convertido em açúcares redutores, substratos para a fermentação. Os adjuntos mais utilizados são o milho, arroz e o trigo. No Brasil por razões econômicas e disponibilidade, é comum a utilização de “gritz” de milho (OETTERER, 2006; VENTURINI FILHO, 2010).

O lúpulo, obtido das flores femininas não fecundadas da planta *Humulus lupulus*, é o ingrediente responsável pelo amargor da cerveja, e além de ser rico em compostos aromáticos, que contribuem para as características sensoriais do produto, apresenta efeito antimicrobiano, que auxilia na conservação do produto (VENTURINI FILHO; CEREDA, 2010; PRIEST; STEWART, 2006). A escolha do tipo de lúpulo, a quantidade e o momento no qual ele é adicionado irão influenciar diretamente nas características do produto.

As leveduras utilizadas na produção da cerveja são espécies do gênero *Saccharomyces*. Para a produção de cervejas Lager são empregadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto que na fermentação de cervejas Ale normalmente são empregadas cepas de *Saccharomyces carlsbergensis*. Essas leveduras consomem os açúcares presentes no mosto, produzindo álcool e gás carbônico, e embora o álcool seja o principal produto de excreção das leveduras, durante a fermentação ocorre a liberação de outros metabólitos que impactam no sabor e aroma da bebida (OETTERER, 2006; VENTURINI FILHO, 2010).

O processo de produção de cerveja contempla as etapas de maltagem, moagem do malte, mosturação, filtração, cozimento do mosto, fermentação, maturação, clarificação, carbonatação e envase (BUGLASS, 2011; VENTURINI FILHO, 2010). As operações de processamento também auxiliam na diferenciação dos produtos obtidos, especialmente etapas como a moagem, como é feito e a duração do cozimento do mosto, fermentação e maturação.

Entre as diversas variedades de cerveja, as Pilsen são caracterizadas por serem cervejas claras, produzidas com malte do tipo

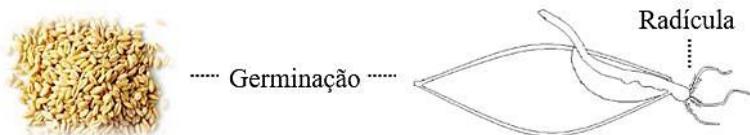
Pilsen, água com pouca dureza, apresentarem teor alcoólico médio e com moderado sabor e aroma do lúpulo. As cervejas denominadas American Lager caracterizam-se por serem cervejas claras, pouco encorpadas, e altamente carbonatadas. Possuem aroma, cor e amargor sutis, não havendo a predominância de características de um ingrediente específico (PRIEST; STEWART, 2006; VENTURINI FILHO, 2010). As cervejas Weiss são caracterizadas pela utilização de trigo como principal carboidrato fermentescível. Esta variedade de cerveja é suave, clara, altamente carbonatada, pode ser filtrada ou não, quando não filtrada apresenta uma turbidez característica devido a presença de leveduras em suspensão (OETTERER, 2006). Já as cervejas Ale normalmente são cervejas bastante aromáticas, com amargor característico do lúpulo, de teor alcoólico que varia de médio a alto e geralmente de cor escura. Esta variedade apresenta diferentes variações, como a Pale Ale, Indian Pale Ale, Brown Ale, Red Ale as quais apresentam sabor ainda mais forte e com amargor característico do lúpulo (PRIEST; STEWART, 2006; VENTURINI FILHO, 2010). No Brasil e no continente americano a cerveja mais consumida é a do tipo Pilsen (OETTERER, 2006).

A qualidade da cerveja pode ser afetada por muitos aspectos, desde a qualidade da matéria-prima até as muitas variáveis envolvidas no processamento. Devido ao seu elevado consumo, a qualidade e segurança na elaboração das cervejas deve ser garantida para que não ofereça riscos à saúde dos consumidores, dessa maneira, o controle da matéria-prima e do produto final é de fundamental importância. O controle de qualidade envolve ensaios microbiológicos, físico-químicos e sensoriais. Entre os físico-químicos é importante avaliar compostos tóxicos possivelmente presentes na cerveja, dentre os quais destacam-se os íons bromato, brometo, nitrato e nitrito.

Dentre os íons citados o bromato é um dos compostos que requer maior atenção, uma vez que é reconhecido pela IARC como carcinogênico para animais e potencialmente cancerígeno para humanos. Também pode causar reações adversas como náusea, vômito, dor abdominal, anemia hemolítica, edema pulmonar e problemas no sistema nervoso central (MARÁK, J. et al., 2012; OTHMAN; AL-ANSI; AL-TUFAIL, 2010).

A cevada e a água podem ser possíveis fontes de bromato em cerveja. Até poucos anos atrás era comum a utilização de bromato de potássio na etapa de maltagem da cevada para inibir o crescimento excessivo da radícula do grão (Figura 23). Esse crescimento excessivo

pode resultar em perdas de rendimento de até 4% em massa de cevada, consequentemente ocasionando perdas econômicas (BUGLASS, 2011).
 Figura 23 - Representação esquemática da formação de radícula em um grão de cevada submetido à germinação.



Fonte: Adaptado de Buglass, 2011.

A presença de bromato em água pode estar associada a seus processos de limpeza e desinfecção como cloração e ozonização. A ozonização de águas que contém brometo naturalmente pode resultar na sua conversão em bromato. O bromato também pode ser formado a partir de soluções concentradas de hipoclorito empregadas na cloração de águas de abastecimento (KHAN, et al., 2014). Ambos os ânions têm mostrado potencial tóxico e sua utilização como aditivos alimentares é proibida no Brasil e em vários outros países, por isso devem ser monitorados na matéria prima e no produto final (MICHALSKI; ŁYKO, 2013; OTHMAN; AL-ANSI; AL-TUFAIL, 2010).

Dada esta proibição, os órgãos reguladores brasileiros e da Comunidade Europeia (EC, do inglês “European Commission”) não estabelecem limites para sua presença em cerveja. Todavia, nos Estados Unidos, é permitida a utilização de bromato de potássio em malte destinado a fabricação de bebidas fermentadas e destiladas até a concentração máxima de 75 mg L^{-1} , e por isso estabelece-se que o resíduo total de brometos no produto final não ultrapasse 25 mg L^{-1} (FDA, 2014; FDA, 2015).

O íon nitrato está presente naturalmente em vegetais e água potável, enquanto que a presença natural de nitrito é menos expressiva, podendo ocorrer devido à redução de nitrato por micro-organismos (SINDELAR; MILKOWSKI, 2012). Além da água, a cevada, o lúpulo e os adjuntos também podem ser fontes de nitrato, e este pode ser reduzido a nitrito durante o processamento da bebida. Nas etapas de cozimento do malte, fermentação do mosto e maturação, o nitrito pode reagir com aminas secundárias e formar N-nitrosaminas, compostos que podem ser carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (BUGLASS, 2011; CREWS, 2010).

Segundo Cádenes et al. (2002) a N-nitrosodimetilamina é a nitrosamina mais frequentemente encontrada em cerveja. Esse composto é formado principalmente durante a etapa de cozimento do malte, pela nitrosação das aminas formadas no processo de germinação da cevada. O agente nitrosante é o nitrito formado a partir da redução do nitrato presente no meio pela ação de bacteriana (CREWS, 2010).

Em baixas concentrações a presença de nitrato pode ser desejável para manutenção da higiene e redução da contaminação microbiana, enquanto que elevados níveis de nitrito poderiam indicar contaminação por efluentes (PRIEST; STEWART, 2006). Embora potencialmente tóxicos não estão previstos em legislações nacionais e internacionais limites máximos para os íons nitrato e nitrito em cerveja.

Como padrões de qualidade de água potável o guia da organização mundial da saúde (WHO, do inglês “World health organization”) recomenda níveis máximos de 0,01 mg L⁻¹ para bromato, 0,5 mg L⁻¹ para brometo, 50 mg L⁻¹ para nitrato e 0,1 mg L⁻¹ para nitrito (WHO, 2011).

Na literatura estão disponíveis vários métodos para análise de bebidas alcoólicas e suas matérias primas, porém, os estudos relacionados à presença dos íons bromato, brometo, nitrato e nitrito em cerveja ainda são praticamente inexplorados. Esses ânions podem ser determinados por métodos espectrofotométricos (KETAI et al., 2000; OYEKUNLE et al., 2014), por quimiluminescência (YAN et al., 2016) e métodos cromatográficos (DALLAGO et al., 2005; DIVJAK; NOVIC; GOESSLE, 1999; KHAN et al., 2014; REDDY-NOONE; JAIN; VERMA, 2007).

Apenas um estudo envolvendo sua determinação em cerveja foi encontrado na literatura até o momento. Khan e colaboradores (2014) propuseram um método de cromatografia líquida de ultra eficiência associada à espectrometria de massas para a determinação de bromato em amostras de cerveja sem álcool. A separação do íon bromato ocorreu em 1 min, e o preparo de amostras envolveu a descarbonatação da amostra, precipitação das proteínas com 5 mL de acetonitrila, agitação por 1 minuto, centrifugação por 10 min, em seguida o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de seringa e analisado. Nas 39 amostras avaliadas, a concentração do íon bromato foi inferior a 15 mg L⁻¹.

Apesar da elevada sensibilidade, os métodos cromatográficos apresentam como principais desvantagens o alto custo operacional e elevado consumo de solventes orgânicos. Neste contexto, a CE apresenta-se como uma técnica capaz de fornecer métodos rápidos para a análise dos ânions com baixo custo operacional e menores impactos ambientais.

Dos métodos por CZE desenvolvidos na última década, as determinações de bromato e brometo foram aplicadas majoritariamente em amostras de água e aditivos de panificação. Enquanto que a determinação de nitrato e nitrito tem sido majoritariamente aplicada a análise de vegetais, água e produtos cárneos. Não havendo relatos de sua aplicação para determinação desses analitos em amostras de cerveja.

Gries et al. (2008) propuseram um método por CZE com detecção fotométrica para determinação de bromato em água. Apesar dos limites de detecção encontrados serem adequados para a proposta (na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$), o método de separação apresentou tempo superior a 4,5 minutos.

Para determinar bromato em melhoradores de farinha, Öztekin, Aydin e Erim (2009) desenvolveram um método utilizando CZE com concentração *on line* (*stacking*), onde a separação foi realizada em 2 min. Apesar do tempo de separação ser relativamente reduzido, o preparo de amostras proposto pelos autores demandou 50 min e foi constituído por múltiplas etapas, o que o torna indesejável para utilização em laboratórios de rotina com elevada demanda de análise.

Para determinar nitratos, nitritos e oxalatos em amostras de vegetais, açúcar e fibras dietéticas, Merusi e colaboradores (2010) desenvolveram um método por CZE. O método permitiu a separação dos analitos em um tempo inferior a 4 minutos, porém, apresentou baixa eficiência e resolução.

Oliveira e colaboradores (2012) desenvolveram um método utilizando CZE para a determinação simultânea de nitrato e nitrito em amostras de água de abastecimento. O método proposto pelos autores apresentou boa simetria e resolução, permitindo a separação dos analitos em 2,3 min.

Della Betta e colaboradores (2014) desenvolveram e validaram um método de CE para a determinação simultânea de nitrato e nitrito em alimentos infantis. O método proposto foi capaz de separar os analitos em menos de 30 s, utilizando um procedimento de preparo de amostras simples.

A CE é uma técnica reconhecida por apresentar reduzidos tempos de separação, contudo a crescente demanda por métodos de análise cada vez mais rápidos levou ao uso de estratégias que buscam reduzir o tempo de análise e aumentar a frequência analítica dos métodos. Dentre as diferentes estratégias destacam-se: a utilização de campos elétricos elevados, SEI, MI, modificações no BGE e superfície interna do capilar, inversão da polaridade durante as corridas e a associação de estratégias.

Uma vez que a utilização dos íons bromato, brometo, nitrato e nitrito é proibida ou limitada em vários países devido a seus aspectos toxicológicos, os objetivos deste trabalho foram:

- i. Desenvolver e validar um método rápido para sua determinação em amostras de cerveja utilizando estratégias para redução do tempo total de análise;
- ii. Avaliar a adequação do método em relação aos princípios da química verde utilizando a Eco-escala;
- iii. Validar o método proposto seguindo o protocolo da Eurachem quanto aos parâmetros de linearidade, efeito de matriz, seletividade, precisão, exatidão, LOD, LOQ e robustez;
- iv. Aplicar o método proposto em amostras de cervejas nacionais e importadas;

Até o presente momento não há relatos na literatura de métodos por CZE para determinação simultânea destes ânions em amostras de alimentos ou bebidas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES

Todas as soluções padrões foram preparadas com reagentes de grau analítico e água desionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA.). Padrões de bromato, brometo e tiocianato de potássio, nitrato e nitrito de sódio, ácido perclórico (70%) e β -alanina foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich (St. Louis, CO, EUA.), e hidróxido de sódio junto a Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

Os padrões de bromato, brometo, nitrato, nitrito e tiocianato em solução aquosa foram preparadas na concentração de 1000 mg L^{-1} , enquanto que as soluções de ácido perclórico e β -alanina foram preparadas na concentração de 100 mmol L^{-1} . Todas as soluções preparadas foram armazenadas sob refrigeração em temperatura de 4°C até o momento da análise, onde foram então gradualmente diluídas até as concentrações requeridas.

2.2 INSTRUMENTAL

Os experimentos foram conduzidos em sistema de CE modelo 7100 da marca Agilent Technologies (Palo Alto, EUA.), equipado com detector de arranjo de diodos, controlador de temperatura e programa de aquisição e tratamento de dados fornecido pelo fabricante (*HP ChemStation*[®]).

Antes do primeiro uso o capilar foi condicionado com 1 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 mol L^{-1} NaOH (10 min), seguido de água desionizada (10 min) e BGE (15 min). Entre as corridas, o capilar foi lavado com o eletrólito por 30 s, e no final de cada dia, fez-se lavagem com 1 mol L^{-1} NaOH (10 min) e água (10 min).

As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida de 32 cm (50 μm d.i. x 375 μm d.e.). O comprimento efetivo do capilar e o tempo de injeção utilizado variou conforme a estratégia de redução de tempo utilizada. Todas as amostras e padrões foram introduzidos no capilar com pressão hidrodinâmica, a tensão aplicada na separação foi 30 kV (polaridade negativa na extremidade de injeção), modo de detecção direto em 200 nm e a temperatura mantida a 25°C .

O BGE utilizado foi composto por ácido perclórico 10 mmol L^{-1} e β -alanina 40 mmol L^{-1} , pH 3,96 (pH calculado utilizando o software

PeakMaster®). Tiocianato foi utilizado I.S. na concentração final de 25 mg L⁻¹.

2.3 AMOSTRAS E PREPARO DE AMOSTRAS

Vinte amostras de cervejas das variedades Pilsen, Lager, Ale e Weiss, de marcas nacionais e importadas foram adquiridas no comércio local da cidade de Florianópolis (SC) e mantidas em temperatura ambiente até o momento das análises (Tabela 14). Todas as amostras foram analisadas em triplicata de preparo e dentro do prazo de validade.

Tabela 14 - Classificação e nacionalidade das amostras utilizadas no estudo

Amostra	Variedades	País de origem
1	Pilsen	Brasil
2	Pilsen	Brasil
3	Pilsen	Brasil
4	Pilsen	Dinamarca
5	Pilsen	China
6	Lager	Brasil
7	Lager	Brasil
8	Lager	Brasil
9	Lager	Bélgica
10	Lager	México
11	Ale	Brasil
12	Ale	Brasil
13	Ale	Brasil
14	Ale	Brasil
15	Ale	EUA
16	Weiss	Brasil
17	Weiss	Brasil
18	Weiss	Brasil
19	Weiss	Alemanha
20	Weiss	Dinamarca

Fonte: o próprio autor.

Após a abertura das embalagens as amostras foram transferidas para tubos de polipropileno para degaseificação em banho de ultrassom por 15 min, filtradas com o auxílio de um filtro seringa de 0,45 µm da marca Millipore (Bedford, MA, EUA), diluídas com I.S. na proporção 9:1 (v/v) e então analisadas no sistema de CE (Figura 24).

Figura 24 - Representação esquemática do procedimento de preparo de amostras proposto



Fonte: o próprio autor.

2.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Os ensaios de validação foram conduzidos seguindo o guia de validação proposto pela Eurachem (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014) e os parâmetros avaliados foram: conformidade do sistema, faixa de trabalho; linearidade; efeito de matriz; seletividade, precisão; LOD; LOQ; e robustez.

Devido à grande variabilidade e disponibilidade de amostras de cerveja, com base nas semelhanças na composição e com base nos rótulos, as mesmas foram divididas em quatro grupos de amostras, e os resultados considerados verdadeiros para as demais amostras dentro do mesmo grupo: (1) Pilsen; (2) Lager; (3) Ale e (4) Weiss.

2.4.1 Conformidade do sistema

A conformidade do sistema foi avaliada a partir do CV (equação 6) das médias obtidas em dez injeções consecutivas de solução dos padrões na concentração de 20 mg L^{-1} . Os parâmetros avaliados foram: área corrigida ($\text{Área}_{\text{analito}}/\text{Área}_{\text{I.S.}}$) e tempo de migração corrigido ($t_{m \text{ analito}}/t_{m \text{ I.S.}}$).

$$\text{CV} (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (6)$$

Sendo:

S, desvio padrão; \bar{x} , média.

2.4.2 Faixa de trabalho e linearidade

A faixa de concentração utilizada para a construção da curva de calibração dos íons brometo, nitrato e nitrito foi de 2,5 a 25 mg L⁻¹. O íon bromato foi avaliado na faixa de concentração de 5,0 a 50 mg L⁻¹, uma vez que este apresenta menor absorvidade molar e portanto, menor sinal analítico.

A avaliação da linearidade foi conduzida tanto nas curvas de calibração em solução padrão, quanto para as curvas preparadas em matriz. Sendo, ambas as curvas construídas em seis níveis de concentração, distribuídos de forma equidistante, preparadas em triplicata e analisadas de forma aleatória no sistema de CE. Devido à ausência de amostras “brancas” para o íon nitrato, as curvas em matriz foram construídas utilizando o método de adição de padrão.

Após a aquisição dos dados, foram construídas curvas de concentração *versus* área corrigida. Seguido da regressão linear, cálculo e construção dos gráficos dos resíduos da regressão, onde é realizada inspeção visual para verificar a presença de tendências e/ou presença de valores discrepantes (*outliers*). A presença de tendências nos gráficos de resíduos da regressão indica possíveis desvios da linearidade.

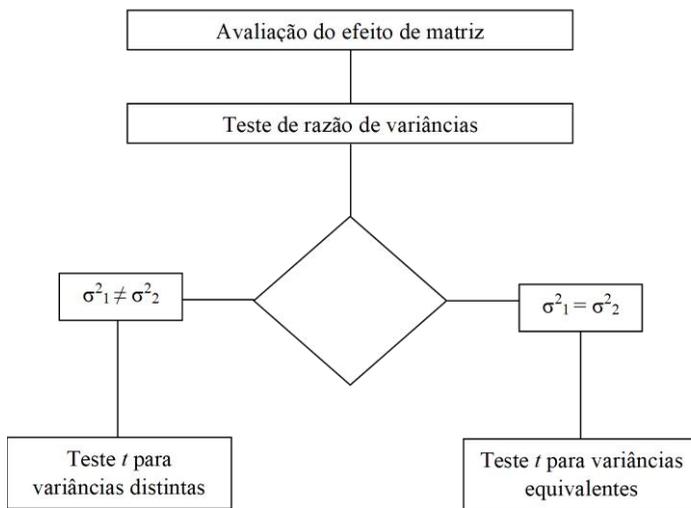
Após a inspeção visual, os valores suspeitos de serem *outliers* foram submetidos ao teste de Grubbs, que permite a remoção de dados discrepantes até 22,2 % do número total de dados (GRUBBS, 1969).

Os parâmetros das curvas de calibração em solução aquosa e matriz foram estimados pelo método dos MMQO, o qual requer o a confirmação de determinadas premissas, por isso os resíduos da regressão foram avaliados quanto a: normalidade por meio do 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); ajuste ao modelo linear por meio do teste F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989).

2.4.3 Efeito de matriz

A avaliação do efeito de matriz foi conduzida para cada um dos quatro grupos de amostras Pilsen, Lager, Ale, Weiss, por meio da comparação das inclinações das curvas em solução padrão e em matriz preparadas em triplicata, utilizando os testes F e teste *t-student* (Figura 25).

Figura 25 - Avaliação do parâmetro efeito de matriz



Fonte: o próprio autor.

No teste de hipóteses considerou-se a equivalência estatística dos coeficientes angulares das curvas em solução aquosa e em matriz como sendo a hipótese nula (H_0), e a existência de diferença significativa entre os referidos coeficientes angulares como hipótese alternativa (H_1). Assim, se t calculado for menor que t tabelado, não há efeito de matriz.

2.4.4 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada com auxílio do *software PeakMaster®* versão 5.3. Ao *software* foram adicionados os dados referentes aos parâmetros de separação (dimensões do capilar, composição do BGE, modo de detecção), os analitos (bromato, brometo, nitrato, nitrito e I.S.) e os possíveis ânions interferentes (oxalato e iodeto). Contudo, visto que o *software* não permite a simulação das injeções múltiplas, os resultados foram avaliados com base no eletroferograma obtido experimentalmente, a partir do qual foi possível determinar a seletividade do método.

2.4.5 Precisão

A repetibilidade (precisão intra-ensaio) foi determinada por meio de três injeções consecutivas de soluções dos padrões dos analitos em três níveis de concentração (10, 15 e 20 mg L⁻¹). Enquanto que a precisão intermediária (precisão inter-ensaio) foi avaliada a partir da injeção de soluções padrões dos analitos nos mesmos três níveis de concentração, analisados pelo mesmo analista em três dias distintos.

Os resultados foram expressos como % CV para os parâmetros tempo de migração corrigido e área corrigida.

2.4.6 Exatidão

A exatidão do método foi determinada por meio de ensaios de recuperação aparente, nos quais as amostras de cerveja foram fortificadas em três níveis de concentração (10, 15, 20 mg L⁻¹) e analisadas em três réplicas independentes. Os valores de recuperação foram calculados a partir da equação 7 e expressos como percentual de recuperação.

$$Rec (\%) = \frac{\text{Camostra fortificada} - \text{Camostra não fortificada}}{\text{Cadicionada na fortificação}} \times 100 \quad (7)$$

2.4.7 LOD e LOQ

Devido à ausência de amostras “brancas”, os parâmetros LOD e LOQ foram determinados por meio da relação sinal ruído. Ambos os parâmetros foram determinados a partir de diluições do ponto inferior da curva de calibração em solução padrão.

O LOD foi estabelecido como sendo a menor concentração detectada dos analitos em solução padrão, equivalente a 3 vezes a relação sinal/ruído. Enquanto que o LOQ foi estabelecido como a menor concentração equivalente a 10 vezes a relação sinal/ruído.

2.4.8 Robustez

A robustez foi avaliada pelo do teste de Youden (YOUTEN; STEINER, 1975), para o qual foram identificados os sete parâmetros cujas variações poderiam afetar o desempenho do método analítico. Os parâmetros escolhidos foram: tensão aplicada; pH do BGE; temperatura de separação; pressão de injeção; comprimento de onda; tempo de lavagem entre corridas; e tempo de injeção.

Após a seleção dos parâmetros analíticos, pequenas variações foram induzidas nas condições nominais do método e oito corridas foram então realizadas para determinar a influência de cada parâmetro nas respostas: concentração (mg L^{-1}); área corrigida ($\text{Área}_{\text{analito}}/\text{Área}_{\text{I.S.}}$); tempo de migração corrigido ($t_{\text{manalito}}/t_{\text{m.I.S.}}$); simetria e resolução.

O delineamento experimental utilizado na condução do teste e os parâmetros analíticos avaliados para as condições nominais (indicadas pelas letras maiúsculas) e alteradas (indicadas pelas letras minúsculas) são apresentadas nas Tabelas 15 e 16, respectivamente.

Tabela 15 - Delineamento experimental empregado no teste de Youden

Parâmetros analíticos	Condição experimental							
	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
Lavagem entre corridas (s)	F	f	f	F	F	f	f	F
Tempo de injeção (s)	G	g	g	G	g	G	G	G
Resultados	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

Fonte: o próprio autor.

Tabela 16 - Parâmetros analíticos avaliados no teste de Youden, condições nominais e alteradas

Parâmetro analítico	Condição experimental							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tensão (kV)	30	30	30	30	29	29	29	29
pH	3,96	3,96	3,87	3,87	3,96	3,96	3,87	3,87
Temperatura (°C)	25	26	25	26	25	26	25	26
Pressão (mbar)	50	50	48	48	48	48	50	50
Comprimento de onda (nm)	200	202	200	202	200	202	200	200
Tempo de lavagem entre corridas (s)	30	20	20	30	30	20	20	30
Tempo de injeção (s)	3	4	4	3	4	3	3	4
Resultados	<i>s</i>	<i>T</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

Fonte: o 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 8.

$$A/a = \left(\frac{s+t+u+v}{4}\right) - \left(\frac{w+x+y+z}{4}\right) \quad (8)$$

2.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após o procedimento de validação analítica, o método proposto foi aplicado à determinação de amostras de cerveja nacionais e importadas.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a construção das curvas de calibração e a determinação dos resíduos da regressão utilizou-se o *software* Microsoft Excel 2013. As premissas de normalidade e homocedasticidade foram avaliadas utilizando o *software Assistat 7.7* (software livre), enquanto que os testes de independência e ajuste ao modelo linear foram calculados utilizando o *software Statistica 12.0*. As curvas de mobilidade *versus* pH foram construídas utilizando o *software Origin 7.0*.

Todos os testes estatísticos foram realizados com nível de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MÉTODO POR CZE

A partir de experimentos prévios e da literatura científica verificou-se que todos os analitos apresentavam absorvidade molar em 200 nm, e desta forma poderiam ser analisados utilizando o modo de detecção direta neste comprimento de onda.

Os dados de pK_a e mobilidade (μ) dos analitos, utilizados posteriormente nas etapas de desenvolvimento do BGE são apresentados na Tabela 17.

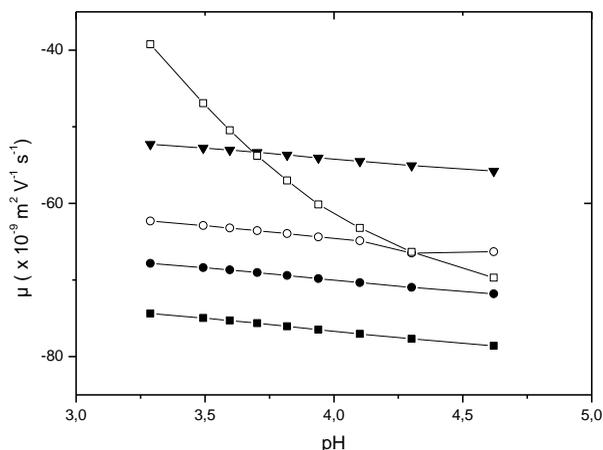
Tabela 17 - Dados de pK_a e mobilidade dos analitos objeto de estudo

Analito	pK_a	μ ($\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Bromato (BrO_3^-)	-2,00	-80,00
Brometo (Br^-)	-2,00	-57,80
Nitrato (NO_3^-)	-1,30	-74,10
Nitrito (NO_2^-)	3,22	-74,60
Média		-71,62

Fonte: *Software PeakMaster®* versão 5.3

A partir da curva de mobilidade efetiva *versus* pH (Figura 26) foi definida a faixa de pH em que os analitos se encontram ionizados.

Figura 26 - Curva de mobilidade efetiva dos analitos *versus* pH. Sendo: (\blacktriangledown) Bromato, (\blacksquare) Brometo, (\circ) I.S. – tiocianato, (\bullet) Nitrato, (\square) Nitrito,



Fonte: o próprio autor.

A partir da Figura 26 foi possível verificar que na faixa de pH entre 3,7 e 4 todos os analitos apresentam diferenças entre suas mobilidades suficientes para permitir sua separação com resolução satisfatória. Na faixa de pH escolhido para a separação, o EOF é negligenciável e, portanto, foi desconsiderado nas simulações que envolveram o desenvolvimento do método.

A escolha dos componentes do BGE foi realizada com auxílio do *software PeakMaster®* versão 5.3, que fornece informações de mobilidade e permite a simulação das separações eletroforéticas com alto grau de similaridade das separações obtidas experimentalmente.

Para exercer a função de co-íon no BGE o íon perclorato ($\mu = -69,8 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) foi escolhido, uma vez que não apresenta absorvidade molar no comprimento de onda escolhido para separação e possui mobilidade similar à mobilidade média dos analitos ($\mu = -71,62 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), minimizando a assimetria das bandas eletroforéticas. Entretanto, o co-íon selecionado não apresenta capacidade tamponante na faixa de pH escolhida para a separação, por isso β -alanina (pK_a 3,43) foi escolhida como contra-íon, a fim de desempenhar essa função no BGE.

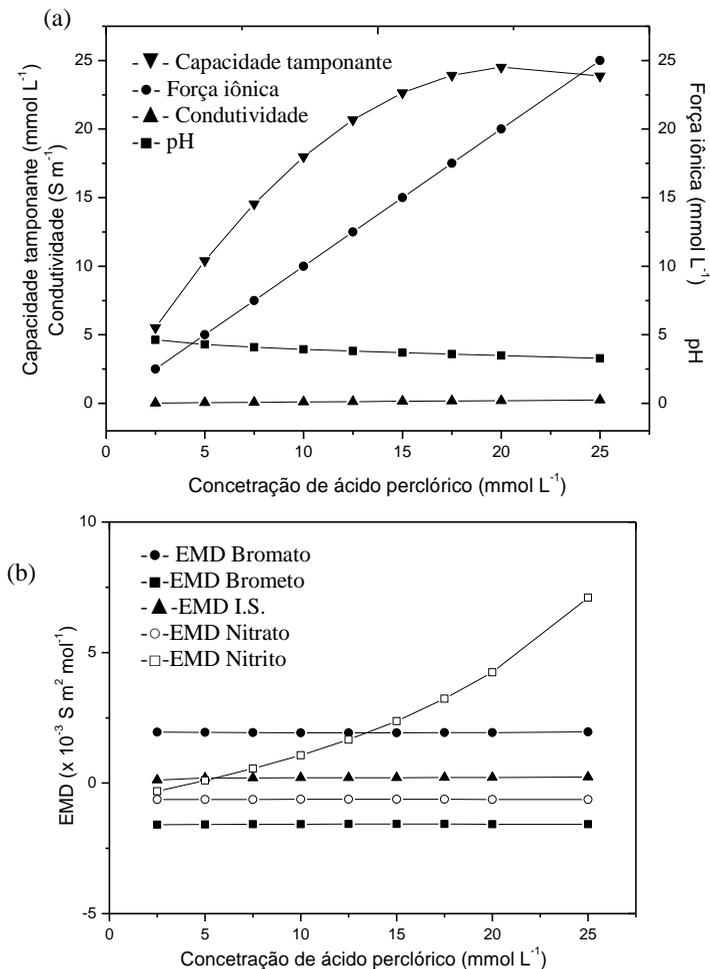
O I.S. escolhido foi o tiocianato, um ânion que apresenta mobilidade ($\mu = -68,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) similar a mobilidade média dos analitos, apresenta absorvidade molar no mesmo comprimento de onda da detecção e não está presente nas amostras analisadas em concentrações detectáveis.

Após a escolha dos componentes do BGE, foram definidos os demais parâmetros instrumentais, como dimensões do capilar ($L_{\text{eff}} = 23 \text{ cm} \times 50 \text{ }\mu\text{m}$ d.i.) e tensão aplicada (30 kV). Amostras e padrões foram introduzidos no capilar utilizando injeção hidrodinâmica.

Depois de definidos os componentes do BGE e parâmetros de separação, as condições de separação foram simuladas utilizando o *software PeakMaster®*, mantendo fixa a concentração de β -alanina em 40 mmol L^{-1} e variando a concentração de ácido perclórico de $2,5$ a 25 mmol L^{-1} . As concentrações de ácido perclórico utilizadas para simulação foram escolhidas por contemplar a faixa de pH previamente estabelecida e relacionada ao pK_a dos analitos. Sendo que, concentrações abaixo de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ apresentam baixa capacidade tamponante e valores acima de 25 mmol L^{-1} tendem a gerar correntes elétricas elevadas e conseqüentemente problemas relacionados a geração de calor no interior do capilar, tais como eletrólise.

Os resultados obtidos nas simulações foram tratados utilizando o *software Origin 7.0* e são apresentados na Figura 27.

Figura 27 – Definição dos parâmetros de separação analítica por meio de simulações no *software PeakMaster®* fixando a concentração de β -alanina (40 mmol L^{-1}) e variando a concentração de ácido perclórico ($2,5$ - 25 mmol L^{-1}). (a) Parâmetros do BGE. (b) EMD *versus* concentração de ácido perclórico.



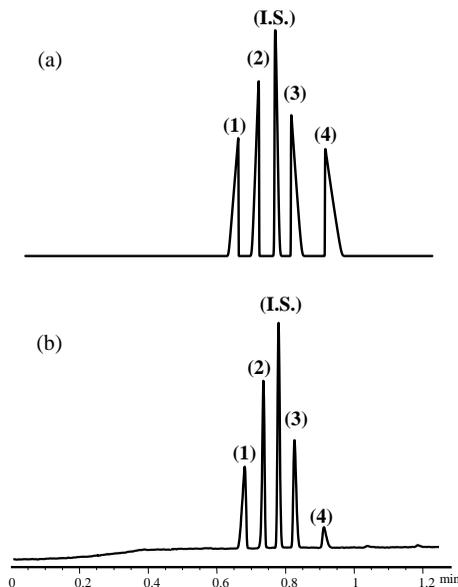
Fonte: o próprio autor.

A partir da Figura 27 foi possível definir como condição ótima, o BGE composto por 10 mmol L^{-1} de ácido perclórico e 40 mmol L^{-1} de β -alanina. Uma vez que este apresentou pH adequado à separação (3,96),

boa capacidade tamponante ($17,98 \text{ mmol L}^{-1}$), baixa condutividade ($0,101 \text{ S m}^{-1}$) e força iônica (10 mmol L^{-1}), além de valores de EMD adequados para todos os analitos ($< 2,5$).

Após definidas as condições de separação, uma análise dos analitos em solução padrão foi realizada com o objetivo de comparar o grau de similaridade entre os resultados obtidos por meio do *software* de simulação *PeakMaster*® e os resultados obtidos experimentalmente, os eletroferogramas desta comparação são apresentados na Figura 28.

Figura 28 - Eletroferograma da separação dos analitos. (a) simulação utilizando o *software PeakMaster*® versão 5.3 e (b) em solução padrão. Legenda: (1) brometo; (2) nitrato; (3) bromato; (4) nitrito. Condições de separação: 10 mmol L^{-1} de ácido perclórico e 40 mmol L^{-1} de β -alanina, pH 3,96, injeção 50 mbar, 3 s, 30 kV, 32 cm ($23,5 \text{ cm} \times 50 \text{ } \mu\text{m d.i.} \times 375 \text{ } \mu\text{m d.e.}$), detecção direta em 200 nm.



Fonte: o próprio autor.

Um alto grau de similaridade foi observado entre os eletroferogramas simulado e experimental em relação aos parâmetros tempo de migração, simetria e resolução. A utilização do *software PeakMaster*® demonstrou ser uma ferramenta importante no desenvolvimento do método, reduzindo o número de experimentos e dispensando a utilização de reagentes na etapa de desenvolvimento.

A partir do eletroferograma dos analitos em solução padrão, pode-se observar ainda que o método proposto apresentou resolução e simetria adequadas. Os ânions estudados apresentam altos valores de mobilidade eletroforética, e no pH de separação o EOF é de baixa magnitude, o que faz com que os analitos migrem de acordo com suas próprias mobilidades independente do fluxo.

A associação entre a utilização de campo elétrico elevado (937,5 V/cm) e a injeção pela extremidade mais afastada do detector permitiu o desenvolvimento de um método capaz de separar os cinco analitos em apenas 54 s (0,9 min).

O tempo total de análise para a injeção única (sem considerar o preparo de amostras), incluindo lavagem entre corridas, permutação de reservatórios de BGE e amostra, injeção da amostra e separação foi de 2,5 min (150 s), o que permite a análise de aproximadamente 24 amostras por hora.

3.2 ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DO TEMPO TOTAL DE ANÁLISE

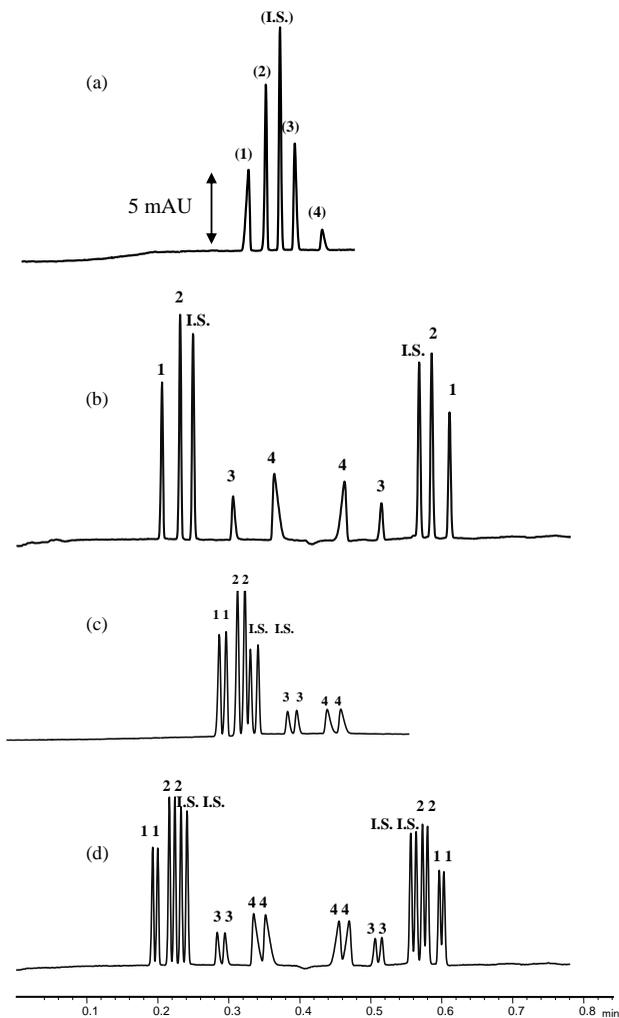
Como visto no item 3.1 deste capítulo, quando utilizado a associação de campo elétrico elevado e a injeção pela extremidade mais afastada do detector obteve-se um método capaz de separar os cinco analitos em apenas 54 s, com tempo total de análise de 2,5 min (150 s), e frequência analítica de cerca de 24 amostras por hora.

Com o objetivo de aumentar ainda mais a frequência analítica do método proposto, foram avaliadas quatro estratégias para redução do tempo total de análise:

1. Injeção de uma única amostra pela extremidade mais próxima do detector (SEI-CZE);
2. Injeção de uma única amostra pela extremidade mais próxima do detector (SEI-CZE) com inversão da polaridade durante a separação;
3. Injeção múltipla de 2 amostras pela extremidade mais próxima do detector (SEI-MI);
4. Injeção múltipla de 2 amostras pela extremidade mais próxima do detector (SEI-MI), com inversão de polaridade durante a separação;

Os eletroferogramas obtidos das quatro estratégias são apresentados na Figura 29.

Figura 29 - Eletroferogramas da separação dos analitos em solução padrão utilizando (a) SEI-CZE; (b) SEI-CZE com inversão da polaridade durante a separação; (c) SEI-MI; (d) SEI-MI com inversão da polaridade durante a separação. Sendo: (1) brometo, (2) nitrato; (I.S.) tiocianato, (3) bromato; (4) nitrito. Condições de separação: capilar 32 cm (8,5 cm \times 50 μ m d.i.). BGE: 10 mmol L⁻¹ de ácido perclórico e 40 mmol L⁻¹ de β -alanina, pH 3,96, -30 kV, detecção direta em 200 nm. Injeção hidrodinâmica.



Fonte: o próprio autor.

Para execução da primeira estratégia (SEI-CZE), as separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida com $L_{eff} = 8,5$ cm. Amostras e padrões foram introduzidos no capilar com injeção hidrodinâmica (-50 mbar/3 s). Os demais parâmetros instrumentais, incluindo tensão e modo de detecção não foram alterados. A separação dos analitos utilizando SEI-CZE em solução padrão é apresentada na Figura 29 (a). A utilização de SEI-CZE permitiu separar os cinco analitos em apenas 24 s, com tempo total de análise de 2,0 min (120 s), resultando assim na análise de cerca de 30 amostras por hora (sem considerar a etapa de preparo de amostras).

A segunda estratégia baseou-se na associação de SEI-CZE e a inversão da polaridade durante a corrida. As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida com $L_{eff} = 8,5$ cm, amostras e padrões foram introduzidos no capilar com injeção hidrodinâmica -50 mbar/3 s. Os demais parâmetros de separação foram mantidos. A separação foi inicialmente realizada com polaridade negativa, e imediatamente após a detecção dos analitos (24 s) a polaridade foi invertida, forçando assim os analitos a passarem novamente pela janela de detecção, porém na ordem inversa à ordem de migração inicial. A mudança na polaridade pode ser observada no eletroferograma por um decréscimo na linha de base, como mostra a Figura 29 (b). Esta estratégia permitiu analisar uma amostra duas vezes na mesma corrida de 36 s, com tempo total de análise de 2,1 min (126 s), resultando assim na análise de cerca de 28 amostras por hora. Contudo, apesar da alta frequência analítica, este modo de injeção não deve substituir o preparo da amostra em diferentes réplicas de preparo.

A terceira estratégia foi avaliada pela associação entre SEI e injeções múltiplas (SEI-MI). As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida com $L_{eff} = 8,5$ cm, seguimentos de amostras e BGE foram introduzidas no capilar hidrodinamicamente da seguinte forma:

- Amostra 1: -40 mbar/ 3 s;
- BGE espaçador: -40 mbar /3 s;
- Amostra 2: -40 mbar/ 3 s.

Os demais parâmetros de separação como tensão e modo de detecção foram mantidos. A Figura 29 (c) apresenta o eletroferograma da separação dos analitos utilizando a associação destas estratégias. A partir da utilização de SEI-MI foi possível separar duas amostras distintas em uma única corrida de apenas 26 s. O tempo total de análise desta estratégia foi de 2,3 min (138 s), o que resulta em uma frequência analítica de 52 amostras/ h. A eliminação da etapa de lavagem entre corridas em

separações utilizando MI tem uma importante contribuição na diminuição do tempo total de análise, o que conseqüentemente aumenta sua frequência analítica.

Na quarta estratégia foi avaliada a associação das estratégias de SEI-MI com inversão da polaridade durante a corrida. As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida com $L_{eff} = 8,5$ cm e seguimentos de amostras e BGE foram introduzidas no capilar hidrodinamicamente da seguinte forma:

- Amostra 1: -40 mbar/ 3 s;
- BGE espaçador: -40 mbar /3 s;
- Amostra 2: -40 mbar/ 3 s.

Os demais parâmetros de separação foram mantidos. A inversão da polaridade foi realizada após 24 s de separação. O eletroferograma da separação é apresentado na Figura 29 (d). A associação das estratégias de SEI, MI e inversão da polaridade, permitiu separação de duas amostras em duas vezes em uma única corrida de 36 s, com tempo total de análise de 2,5 min (150 s), o que representa uma frequência de cerca de 48 amostras por hora.

Apesar de todas as estratégias avaliadas apresentarem resultados satisfatórios para promover a obtenção de um método rápido, a associação de SEI-MI resultou na maior frequência analítica 52 amostras/ h. Além da obtenção de separações mais rápidas a utilização dessa associação de estratégias resulta em uma aleatoriedade única pela possibilidade de injeção de amostras e padrões em uma mesma corrida, além da facilidade de aquisição dos dados em um único eletroferograma. Características altamente desejáveis em laboratórios de análise de rotina, assim esta associação de estratégias foi escolhida para ser validada e aplicada na análise de bromato, brometo, nitrato e nitrito em amostras de cerveja.

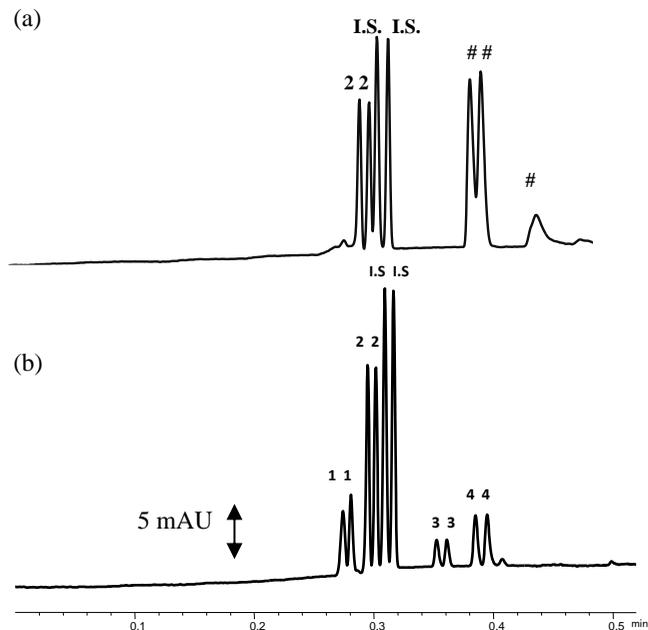
Os estudos envolvendo a utilização de diferentes estratégias para a redução do tempo total de análise são limitados na literatura e até o presente momento não há relatos sobre a utilização da associação de SEI-MI aplicadas em análise de alimentos.

3.3 PREPARO DE AMOSTRAS

Devido a elevada solubilidade dos analitos e as características da amostra, foram requeridos apenas pré-tratamentos mínimos como descarbonatação, filtração e diluição com I.S.

Na Figura 30 são apresentados eletroferogramas da separação dos analitos em amostras e em uma solução de amostra adicionada de padrões.

Figura 30 - Eletroferograma da separação dos analitos utilizando SEI-MI. Em amostra (a) cerveja Ale 1 e cerveja Ale 2. (b) Padrões + amostra Lager. Sendo: (1) – brometo, (2) - nitrato; (I.S.) – Tiocianato, (3) - bromato; (4) – nitrito, (#) – desconhecido. Condições de separação: capilar 32 cm (8,5 cm \times 50 μ m d.i. \times 375 μ m d.e.). BGE: 10 mmol L⁻¹ de ácido perclórico e 40 mmol L⁻¹ de β -alanina, pH 3,96, -30 kV, detecção direta em 200 nm.



Fonte: próprio autor.

Por ser um método direto e pelo fato da filtração em filtro de seringa ser o único pré-tratamento de limpeza da amostra antes da análise, pode-se concluir que o método apresentou uma boa seletividade quanto a presença de compostos interferentes. Apesar da presença de algumas bandas desconhecidas no eletroferograma é possível verificar que estas não interferiram na separação dos analitos.

Foram conduzidas diversas simulações no software *PeakMaster*® a fim de tentar identificar as bandas desconhecidas presentes nos eletroferogramas das amostras, contudo não se obteve êxito, assim, trabalhos futuros serão conduzidos em ordem de identificar estas bandas.

O preparo de amostras proposto mostrou ser simples e rápido, seguindo os princípios da química verde e que são desejáveis em laboratórios de análise de rotina.

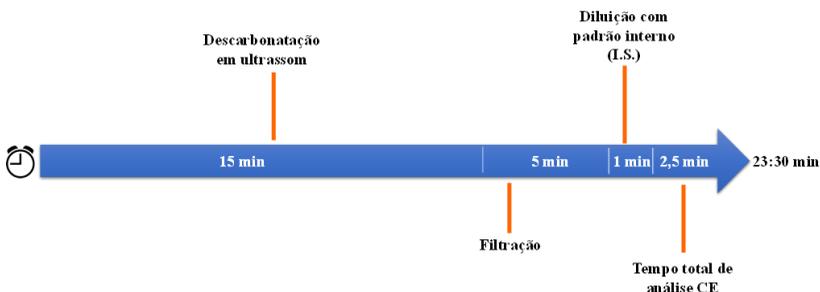
3.4 ADEQUAÇÃO DO MÉTODO AOS PRINCÍPIOS DA QUÍMICA VERDE

O método proposto foi avaliado quanto a sua adequação aos princípios da química verde, em relação aos parâmetros: tempo total de análise, geração de resíduos e Eco-escala.

O potencial de geração de resíduos do método por CZE foi de cerca de 23 mL, sendo que a construção da curva de calibração em triplicata tem a maior contribuição para o volume total de resíduos, cerca de 19 mL, enquanto que o volume de BGE e a diluição da amostra com padrão interno contribuem de forma menos expressiva para a geração de resíduos, 4 mL e 50 µL, respectivamente. A ausência de procedimentos de extração dos analitos e outras etapas no preparo de amostras contribuíram de forma importante para sua baixa geração de resíduos.

A Figura 31 ilustra o tempo gasto em todas as etapas de execução do método por CZE, exceto pela preparação da curva de calibração e condicionamentos do capilar no início e fim do dia.

Figura 31 - Tempo de execução por amostra do método por CZE proposto para determinação simultânea de bromato, brometo, nitrato e nitrito em amostras de cerveja



Fonte: o próprio autor.

A partir da Figura 31 é possível observar que, a etapa com maior contribuição para o tempo de execução da análise foi o preparo de amostras.

Para o cálculo da eco-escala foram considerados todos os aspectos referentes às etapas de execução do método, desde o preparo de amostras até a análise instrumental, como apresentado na Tabela 18.

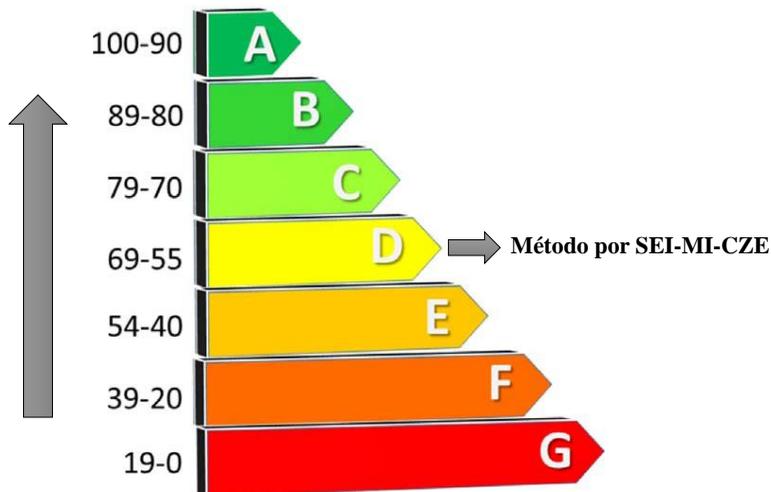
Tabela 18 - Eco-escala do método por CZE para determinação simultânea de bromato, brometo, nitrato e nitrito

Eco-escala				
Reagentes	Quantidade	Pictogramas de risco	Risco	Penalização
B-alanina	1	0	0	0
Ácido perclórico	1	4	2	8
Bromato de potássio	1	3	2	6
Brometo de potássio	1	1	1	1
Nitrato de sódio	1	2	1	2
Nitrito de sódio	1	3	2	6
Tiocianato de potássio	1	1	1	1
Hidróxido de sódio	1	1	1	1
Total reagentes				25
Consumo de energia		Quantidade	Penalização	
Ultrassom		<0,1 kW/h	0	
CE		<0,1 kW/h	0	
Risco ocupacional		Risco	Penalização	
		1	1	
Resíduos	Quantidade	Risco	Penalização	
	5	1	5	
Total de penalizações				31
Eco-escala				69

Fonte: o próprio autor.

A partir da Tabela 18, verificou-se que o método proposto pode ser considerado adequado aos princípios da química verde, visto que obteve pontuação superior a 50 na eco-escala proposta por GALUSZKA et al. (2012). A adequação à química verde do método é ilustrada na Figura 32.

Figura 32 - Adequação à química verde do método por SEI-MI-CZE para determinação simultânea de bromato, brometo, nitrato e nitrito segundo a Eco-escala



Adequação a química verde

Fonte: o próprio autor.

A toxicidade dos analitos, especialmente bromato e nitrito e a inflamabilidade do ácido perclórico (componente do BGE) contribuíram para as altas penalizações recebidas pelos reagentes no método por CZE, mesmo que utilizados de forma diluída e em pequenos volumes estes recebem penalizações severas, o que contribuiu de forma importante para o valor obtido na Eco-escala.

O risco ocupacional do método por CZE foi considerado baixo, pois desde que sejam seguidos todos os procedimentos de manejo e boas práticas laboratoriais, não há grandes riscos ao analista.

O consumo de energia pelos equipamentos utilizados foi menor que 0,1 kW/h e portanto não receberam penalizações.

O preparo de amostras utilizado no método proposto contribuiu para seu *status* de química verde, uma vez que não foram necessárias

etapas de extração dos analitos, não foi utilizado nenhum solvente orgânico, apresenta baixo consumo de energia e baixo potencial de geração de resíduo.

Alguns trabalhos utilizando a Eco-escala podem ser encontrados na literatura porém sua aplicação está concentrada em amostras de fármacos e amostras ambientais, não havendo até o momento estudos prévios da aplicação da Eco-escala em análise de alimentos.

Tobiszewski, Bigus e Namieśnik (2014) utilizaram a Eco-escala para avaliar um método utilizando microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia à gás bidimensional acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em água. Segundo os autores a Eco-escala obtida pelo método foi 77, e os principais pontos de penalização foram os reagentes utilizados na extração dos analitos (metanol e percloroetileno) bem como a energia consumida durante a análise cromatográfica.

Gallart-Mateu e colaboradores (2017) utilizaram a Eco-escala para avaliação de um método utilizando espectrometria de mobilidade iônica para determinação de cloreto de benzalcônio em fármacos e água proveniente de piscinas. Segundo os autores para o cálculo da Eco-escala considerou-se todos os parâmetros do procedimento analítico que poderiam gerar algum tipo de impacto ambiental e o resultado obtido foi de 91, ou seja, excelente para a química verde.

A utilização da Eco-escala na classificação de um método segundo a química verde é algo recente na comunidade científica, mas que vem crescendo nos últimos anos, pois se baseia em dados quantitativos eliminando a subjetividade de utilização do termo química verde. Contudo alguns aspectos da escala podem ser melhorados, especialmente no que diz respeito às penalizações referentes ao consumo de reagentes e geração de resíduos, para assim obter dados mais coerentes.

3.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

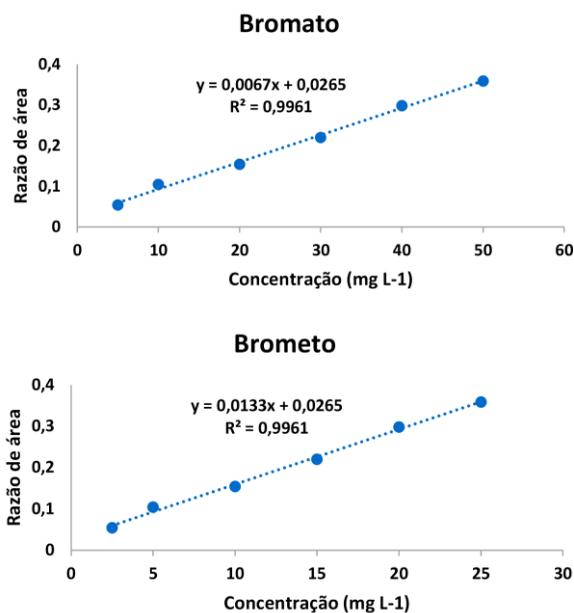
3.5.1 Conformidade do sistema

Os CV para a conformidade do sistema variaram de 0,10 a 0,33 % para o parâmetro tempo de migração corrigido, e de 0,04 a 3,33 % para a área corrigida, resultados que demonstram a capacidade do equipamento utilizado em fornecer dados analíticos precisos.

3.5.2 Linearidade

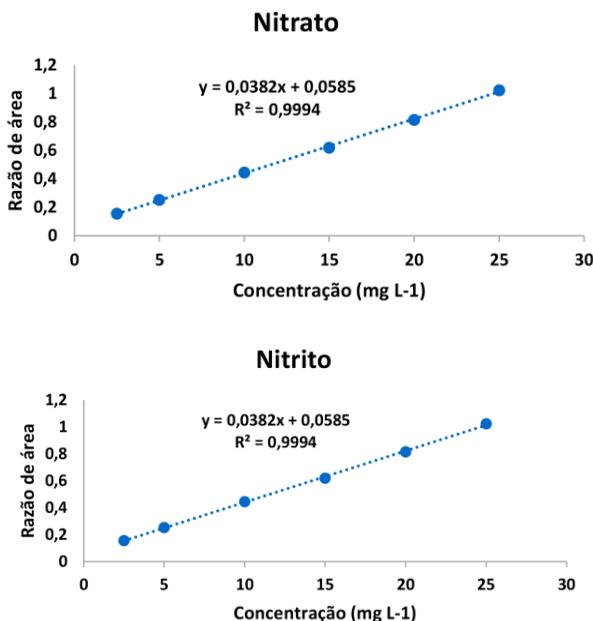
A partir dos dados obtidos experimentalmente foram construídas as curvas de calibração dos analitos em solução aquosa e em matriz para os diferentes tipos de cerveja. As curvas de calibração dos analitos em solução aquosa dos íons bromato e brometo são apresentadas na Figura 33 enquanto que para os íons nitrato e nitrito são apresentadas na Figura 34.

Figura 33 - Curvas de calibração dos analitos em solução padrão dos íons bromato, e brometo



Fonte: o próprio autor.

Figura 34 - Curvas de calibração dos analitos em solução padrão dos íons nitrato e nitrito



Fonte: o próprio autor.

Todas as curvas apresentaram coeficiente de determinação (R^2) maior ou igual a 0,99. Após a inspeção visual dos gráficos de resíduos da regressão, os possíveis *outliers* foram avaliados pela aplicação do teste de Grubbs, dos quais nenhum ponto foi confirmado e, portanto, todos os dados foram mantidos.

As premissas normalidade, homoscedasticidade, independência dos resíduos e ajuste ao modelo linear foram confirmadas, comprovando a linearidade da faixa de trabalho avaliada para as curvas em solução padrão e curvas de matriz de todos os analitos.

3.5.3 Efeito de matriz

A partir dos resultados do teste *t* descartou-se a presença de efeito de matriz para os íons avaliados nas quatro variedades de cerveja, assim a quantificação destes íons pode ser realizada pelo método de calibração em solução padrão (dados não mostrados).

3.5.4 Seletividade

As amostras de cerveja podem conter diversos compostos iônicos ou ionizáveis, entretanto, vários possíveis interferentes com características químicas e mobilidade semelhantes aos analitos em estudo não apresentam absorvidade na região UV/Vis, desta forma, não são considerados interferentes quando empregado detecção direta.

A partir do eletroferograma obtido experimentalmente, verificou-se a capacidade do método em separar os analitos na presença dos interferentes testados, iodeto e oxalato (dados não mostrados).

3.4.5 Precisão

Os resultados dos ensaios de precisão são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Resultados de repetibilidade e precisão intermediária obtida para os ânions bromato, brometo, nitrato e nitrito

Analito	Repetibilidade (CV%) n= 3		Precisão intermediária (CV%) n= 9	
	Tempo de migração corrigido	Área corrigida	Tempo de migração corrigido	Área corrigida
Bromato	1,00	1,29	0,94	2,68
Brometo	0,65	2,74	0,90	3,84
Nitrato	0,19	2,76	0,29	3,05
Nitrito	0,76	0,28	0,74	3,18

Fonte: o próprio autor.

Os valores de CV do tempo de migração corrigido foram menores que 1% para todos os analitos, tanto para a repetibilidade quanto para a precisão intermediária. Para o parâmetro área corrigida os valores de repetibilidade e precisão intermediária foram menores que 4%. Resultados que confirmam a precisão do método proposto nas condições avaliadas (AOAC INTERNATIONAL, 2012).

3.4.6 Exatidão

As médias dos resultados para a recuperação aparente dos analitos em estudo nas diferentes matrizes são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Resultados de recuperação aparente em amostras de cerveja em diferentes níveis de fortificação

Recuperação aparente (%)					
Amostra	Nível de fortificação	Bromato	Brometo	Nitrato	Nitrito
Pilsen	10 mg L ⁻¹	95,6 ± 4,31	94,2 ± 4,47	92,6 ± 3,33	87,0 ± 2,37
	15 mg L ⁻¹	99,9 ± 1,27	98,9 ± 0,70	97,0 ± 1,92	92,5 ± 2,76
	20 mg L ⁻¹	98,0 ± 0,92	99,9 ± 1,00	98,2 ± 1,85	90,9 ± 1,07
Lager	10 mg L ⁻¹	76,5 ± 1,62	79,9 ± 3,85	81,1 ± 3,27	99,9 ± 1,16
	15 mg L ⁻¹	77,2 ± 1,39	78,6 ± 2,71	77,2 ± 0,79	86,7 ± 2,30
	20 mg L ⁻¹	81,7 ± 1,13	79,1 ± 3,85	79,3 ± 4,57	82,8 ± 2,51
Ale	10 mg L ⁻¹	94,0 ± 2,13	99,2 ± 3,31	102 ± 1,65	102 ± 2,00
	15 mg L ⁻¹	100 ± 3,22	102 ± 3,29	100 ± 1,62	104 ± 0,10
	20 mg L ⁻¹	101 ± 2,44	103 ± 3,47	101 ± 2,65	100 ± 1,16
Weiss	10 mg L ⁻¹	100 ± 3,81	97,0 ± 3,06	96,2 ± 2,97	89,9 ± 2,19
	15 mg L ⁻¹	95,6 ± 3,25	98,8 ± 2,81	99,5 ± 1,10	86,7 ± 3,82
	20 mg L ⁻¹	98,0 ± 2,45	99,7 ± 3,00	99,5 ± 3,22	88,4 ± 0,75

* Resultados expressos como média ± desvio padrão. n=3

Fonte: o próprio autor.

Os resultados de recuperação aparente para cerveja Pilsen variaram de 87,0 a 99,9 %, para cerveja Lager de 76,5 a 99,9 %, para cerveja Ale de 94,0 a 104 % e para cerveja Weiss de 86,7 a 100 %. A AOAC International (2012) estabelece recomendações para a adequação dos resultados de recuperação com base na concentração dos analitos. Para analitos presentes, por exemplo, na concentração de 10 mg kg⁻¹ considera-se como aceitáveis valores entre 80-110%. Assim, os resultados apresentados são majoritariamente adequados, confirmando assim a exatidão do método proposto.

3.4.7 LOD e LOQ

Os resultados de LOD e LOQ obtidos experimentalmente são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Resultados obtidos para os parâmetros LOD e LOQ para os ânions bromato, brometo, nitrato e nitrito

Parâmetro	Bromato	Brometo	Nitrato	Nitrito
LOD (mg L ⁻¹)	0,75	0,18	0,09	0,15
LOQ (mg L ⁻¹)	2,4	0,62	0,30	0,49

Fonte: o próprio autor.

Os resultados de LOD variaram de 0,09 a 0,75 mg L⁻¹, enquanto que os resultados de LOQ variaram de 0,30 a 2,4 mg L⁻¹. Limites considerados satisfatórios para os níveis dos analitos nas amostras de cerveja.

3.4.8 Robustez

Os resultados de robustez obtidos por meio do teste de Youden para os ânions bromato, brometo, nitrato e nitrito são apresentados nas Tabelas 22, 23, 24 e 25, respectivamente.

Tabela 22 - Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o íon bromato.

Parâmetro	Área corrigida	Tempo de migração corrigido	Concentração (mg L ⁻¹)	Simetria	Resolução
Tensão	0,237 - 0,236 = 0,001	1,202 - 1,204 = -0,002	29,305 - 29,131 = 0,175	0,679 - 0,647 = 0,033	5,457 - 4,118 = 1,339
pH	0,242 - 0,232 = 0,010	1,217 - 1,188 = 0,029	29,855 - 28,552 = 1,303	0,650 - 0,719 = -0,069	5,324 - 4,252 = 1,072
Temperatura	0,222 - 0,252 = -0,030	1,204 - 1,202 = 0,002	27,262 - 31,174 = -3,912	0,705 - 0,622 = 0,083	4,482 - 5,094 = -0,611
Pressão	0,236 - 0,238 = -0,002	1,203 - 1,202 = 0,001	29,085 - 29,351 = -0,266	0,699 - 0,627 = 0,072	4,209 - 5,367 = -1,158
Comprimento de onda	0,222 - 0,252 = -0,030	1,204 - 1,202 = 0,002	27,262 - 31,174 = -3,912	0,705 - 0,622 = 0,083	4,482 - 5,094 = -0,611
Tempo de lavagem	0,232 - 0,242 = -0,010	1,203 - 1,202 = 0,001	28,581 - 29,855 = -1,275	0,668 - 0,658 = 0,011	4,826 - 4,750 = 0,076
Tempo de injeção	0,242 - 0,231 = 0,010	1,206 - 1,199 = 0,007	29,902 - 28,535 = 1,367	0,713 - 0,613 = 0,100	4,949 - 4,627 = 0,322

Fonte: o próprio autor.

Tabela 23 - Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o íon brometo.

Parâmetro	Área corrigida	Tempo de migração corrigido	Concentração (mg L ⁻¹)	Simetria	Resolução
Tensão	0,586 - 0,562 = 0,024	0,852 - 0,850 = 0,002	15,908 - 15,244 = 0,664	1,264 - 1,322 = -0,059	4,410 - 3,379 = 1,031
pH	0,539 - 0,609 = -0,070	0,843 - 0,858 = -0,015	14,606 - 16,547 = -1,941	1,125 - 1,461 = -0,337	4,655 - 3,134 = 1,521
Temperatura	0,576 - 0,571 = 0,005	0,849 - 0,852 = 0,003	15,647 - 15,506 = 0,141	1,180 - 1,262 = -0,082	3,523 - 4,267 = -0,744
Pressão	0,570 - 0,577 = -0,007	0,851 - 0,850 = 0,001	15,485 - 15,668 = -0,183	1,327 - 1,259 = 0,068	3,771 - 4,019 = -0,247
Comprimento de onda	0,577 - 0,571 = 0,005	0,849 - 0,852 = -0,003	15,647 - 15,506 = 0,141	1,180 - 1,406 = -0,226	3,523 - 4,267 = -0,744
Tempo de lavagem	0,563 - 0,584 = -0,022	0,851 - 0,851 = 0,000	15,277 - 15,875 = -0,598	1,329 - 1,258 = 0,071	4,162 - 3,628 = 0,535
Tempo de injeção	0,567 - 0,580 = -0,013	0,850 - 0,852 = -0,002	15,401 - 15,752 = -0,351	1,173 - 1,413 = -0,240	4,329 - 3,461 = 0,868

Fonte: o próprio autor.

Tabela 24 - Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o íon nitrato.

Parâmetro	Área corrigida	Tempo de migração corrigido	Concentração (mg L ⁻¹)	Simetria	Resolução
Tensão	0,866 – 0,841 = 0,025	0,937 – 0,935 = 0,001	16,170 – 15,684 = 0,486	1,160 – 1,140 = -0,220	1,900 – 1,162 = 0,738
pH	0,852 – 0,856 = -0,005	0,932 – 0,940 = -0,008	15,883 – 15,971 = -0,088	1,163 – 1,137= 0,026	1,747 – 1,314= 0,433
Temperatura	0,791 – 0,917 = -0,126	0,935 – 0,936 = -0,001	14,713 – 17,141 = -2,429	1,163 – 1,330= -0,167	1,461 – 1,601 = -0,140
Pressão	0,845 – 0,863 = -0,018	0,936 – 0,935 = 0,001	15,751 – 16,103 = -0,352	1,163 – 1,137= -0,026	1,461 – 1,601 = -0,104
Comprimento de onda	0,795 – 0,917 = -0,122	0,935 – 0,936 = -0,001	14,713 – 17,141 = -2,429	1,260 – 1,040= 0,020	1,596 – 1,465 = 0,131
Tempo de lavagem	0,838 – 0,870 = -0,031	0,936 – 0,936 = 0,000	15,623 – 16,231 = -0,608	1,189 – 1,111= 0,077	1,477 – 1,585 = -0,108
Tempo de injeção	0,871 – 0,837 = 0,034	0,935 – 0,937 = -0,002	16,254 – 15,60 0= 0,654	1,144 – 1,156= -0,012	1,644 – 1,417 = 0,228

Fonte: o próprio autor.

Tabela 25 - Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria e resolução do método para o íon nitrato.

Parâmetro	Área corrigida	Tempo de migração corrigido	Concentração (mg L ⁻¹)	Simetria	Resolução
Tensão	0,721 – 0,670 = 0,051	1,553 – 1,561 = -0,008	17,116 – 15,902 = 1,213	0,294 – 0,344 = -0,050	8,360 – 7,104 = 1,256
pH	0,684 – 0,707 = -0,023	1,363 – 1,752 = -0,389	16,669 – 16,790 = -0,121	0,368 – 0,247 = 0,121	6,320 – 9,144 = -2,824
Temperatura	0,634 – 0,758 = -0,124	1,561 – 1,554 = 0,007	15,023 – 17,995 = -2,972	0,332 – 0,306 = 0,026	7,230 – 8,234 = -1,004
Pressão	0,670 – 0,721 = -0,051	1,552 – 1,563 = -0,011	15,894 – 17,124 = -1,229	0,317– 0,321 = -0,003	7,603 – 7,861 = -0,258
Comprimento de onda	0,634 – 0,758 = -0,124	1,561 – 1,554 = 0,007	15,023 – 17,995 = -2,972	0,332 – 0,306 = 0,026	7,230 – 8,234 = 1,004
Tempo de lavagem	0,689 – 0,702 = -0,013	1,549 – 1,565 = -0,016	16,349 – 16,669 = -0,319	0,326 – 0,312 = -0,013	7,966 – 7,499 = 0,467
Tempo de injeção	0,706 – 0,685 = 0,022	1,561 – 1,553 = 0,008	16,769 – 16,249 = 0,520	0,354 – 0,284 = 0,070	7,529 – 7,935 = -0,406

Fonte: o próprio autor.

A partir das informações obtidas verificou-se que a maior variação foi de 1,52 para a resolução do brometo quando o pH foi alterado, contudo, este valor foi considerado pouco significativo para a determinação. Confirmando assim, a robustez do método proposto nas condições avaliadas.

3.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após ser validado, o método proposto utilizando SEI-MI foi aplicado na determinação simultânea de bromato, brometo, nitrato e nitrito em vinte amostras de cervejas nacionais e importadas. Os resultados da quantificação são apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 - Resultados para quantificação de bromato, brometo, nitrato e nitrito em cervejas nacionais e importadas

Amostras	Brometo (mg L⁻¹)	Nitrato (mg L⁻¹)	Bromato (mg L⁻¹)	Nitrito (mg L⁻¹)
1	< LOD	8,12 ± 1,00	< LOD	< LOD
2	< LOD	1,95 ± 0,37	< LOD	< LOD
3	< LOD	4,55 ± 0,13	< LOD	< LOD
4	< LOD	2,15 ± 0,22	< LOD	< LOD
5	< LOD	15,4 ± 0,74	< LOD	< LOD
6	< LOD	0,41 ± 0,07	< LOD	< LOD
7	< LOD	4,54 ± 0,71	< LOD	< LOD
8	< LOD	0,43 ± 0,24	< LOD	< LOD
9	< LOD	2,29 ± 0,08	< LOD	< LOD
10	< LOD	6,18 ± 0,17	< LOD	< LOD
11	< LOD	17,1 ± 1,21	< LOD	< LOD
12	< LOD	37,5 ± 0,48	< LOD	< LOD
13	< LOD	10,1 ± 0,80	< LOD	< LOD
14	< LOD	5,29 ± 0,21	< LOD	< LOD
15	< LOD	54,1 ± 1,20	< LOD	< LOD
16	< LOD	3,85 ± 0,11	< LOD	< LOD
17	< LOD	0,22 ± 0,09	< LOD	< LOD
18	< LOD	3,24 ± 0,05	< LOD	< LOD
19	< LOD	7,22 ± 0,07	< LOD	< LOD
20	< LOD	2,64 ± 0,05	< LOD	< LOD

Amostras de 1-5 cerveja Pilsen; 6-10 cerveja American Lager; 11-15 cerveja Ale; 16-20 cerveja Weiss.

* Resultados expressos como média ± desvio padrão. n=3

Fonte: o próprio autor.

Em todas as vinte amostras de cervejas nacionais e importadas avaliadas, as concentrações dos íons bromato, brometo e nitrito foram menores que o LOD, inclusive para a amostra importada dos Estados Unidos, onde é permitida a adição de bromato de potássio em malte. Resultados considerados adequados, uma vez que o uso de bromatos e brometos como aditivos é proibido em alimentos e bebidas produzidos e comercializados no Brasil e em diversos países da EC. Khan e colaboradores (2014) avaliaram a presença do íon bromato em 39 amostras de cerveja sem álcool comercializadas na Arábia Saudita utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas e encontraram concentrações do íon de até 15 mg L⁻¹ nas amostras avaliadas. A presença de bromato nas amostras provavelmente está associada a utilização de água obtida a partir de processos como ozonização, o qual tende a favorecer a formação do íon.

Apesar da possibilidade de estarem presentes em cerveja, especialmente pela redução de bromato e nitrato, não há relatos na literatura sobre a determinação de brometo e nitrito nessas amostras.

O íon nitrato foi quantificado em todas as amostras, em concentrações que variaram de 0,41 a 54,1 mg L⁻¹. Das cervejas avaliadas, as do tipo Ale apresentaram os maiores níveis de nitrato. A amostra 15, originária dos EUA apresentou a maior concentração de nitrato dentre todas as amostras avaliadas (54,1 ± 1,20 mg L⁻¹). Além da água que pode ser fonte de nitrato, ingredientes como malte, adjuntos e o lúpulo podem contribuir para a maior concentração de nitrato na bebida (BUGLASS, 2011). Apesar das legislações brasileiras e internacionais não estabelecerem limites para nitrato e nitrito em cerveja, devido a possível formação de nitrosaminas e a alta toxicidade destes compostos, o recomendável seria que o seu conteúdo fosse o mais baixo possível para reduzir a exposição dos consumidores a estes compostos potencialmente carcinogênicos.

4 CONCLUSÕES

O método de CZE proposto permitiu separar simultaneamente os íons bromato, brometo, nitrato e nitrito. A associação das estratégias de injeção pela extremidade mais próxima ao detector e injeções múltiplas (SEI-MI) permitiu a determinação de duas amostras em uma única corrida de 138 s (2,3 min).

O *software Peakmaster*® foi uma ferramenta importante durante o desenvolvimento do método evitando o consumo desnecessário de reagentes.

O preparo de amostra desenvolvido mostrou-se adequado para a extração dos analitos nas amostras. Além de ser de simples execução, não utiliza nenhum solvente ou reagente, contribuindo assim para a minimização da geração de resíduos.

O procedimento analítico desenvolvido foi classificado como adequado à química verde segundo sua Eco-escala.

Quando validado, o método apresentou resultados adequados em todos os parâmetros estudados, mostrando-se capaz de fornecer dados analíticos confiáveis para a determinação dos íons estudados em amostras de cervejas nacionais e importadas. Em todas as amostras avaliadas as concentrações de bromato, brometo e nitrito foram menores que o limite de detecção, enquanto que todas as amostras apresentaram nitrato na composição.

Devido à simplicidade do preparo de amostras e rapidez na execução, o método apresenta potencial para aplicação tanto em laboratórios de indústrias cervejeiras quanto em laboratórios de análise fiscal para avaliação da qualidade de cervejas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os trabalhos aqui apresentados ilustram o potencial da CE na obtenção de métodos rápidos, e como a racionalização das etapas de desenvolvimento resulta em métodos com bom desempenho analítico, e que mostram-se robustos a suas aplicações.

Ambos os métodos apresentaram elevada frequência analítica, utilizam preparo de amostras simples, praticamente livre de reagentes e ambientalmente amigáveis, apresentando potencial para aplicação na avaliação das amostras objeto deste estudo e de aplicação em outras matrizes alimentícias.

Em conclusão, foi possível verificar que ambos os métodos apresentam potencial para aplicação tanto em laboratórios de indústrias, prestação de serviço ou mesmo de órgãos reguladores para determinação dos analitos estudados em produtos cárneos e cervejas.

REFERÊNCIAS

ALTRIA, K. D.; KELLY, M. A.; CLARK, B. J. The use of a short-end injection procedure to achieve improved performance in capillary electrophoresis. **Chromatographia**, v. 43, n. 3, p. 153-158, 1996.

AMINI, A. et al. Principles for different modes of multiple-injection CZE. **Electrophoresis**, v. 29, p. 3952–3958, 2008.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**, Oxford University Press: New York, 1998, p.30

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

ANDRÉE, S. et al. Chemical safety of meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, p. 38-48, 2010.

AOAC INTERNATIONAL. **Appendix D:** Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, 2005b.

AOAC INTERNATIONAL. **Appendix F:** Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. p. 1–17, 2012.

AOAC INTERNATIONAL, Meat and meat products, Method 973.31 – Nitrite in cured meat. In: **Official methods of analysis of AOAC International**. Washington: AOAC, 2005a. p. 8-9.

ARMENTEROS, M.; ARISTOY, M.; TOLDRÁ, F. Evolution of nitrate and nitrite during the processing of dry-cured ham with partial replacement of NaCl by other chloride salts. **Meat Science**, v. 91, p. 378–381, 2012.

AZEVEDO, M. S. et al. Screening and determination of aliphatic organic acids in commercial Brazilian sugarcane spirits employing a new method involving capillary electrophoresis and a semi-permanent adsorbed polymer coating. **Food Research international**, v. 60, p. 123-130, 2014.

BECKERS, J. L.; BOČEK, P. The preparation of background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Golden rules and pitfalls. **Electrophoresis**, v. 24, p. 518–535, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Brasília: 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999. **Métodos analíticos físico-químicos, para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura**. Brasília: 1999.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Ofício Circular nº 15/2009/GAB/DIPOA**. 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 51, de 29 de Dezembro de 2006. **Regulamento Técnico de atribuição de aditivos, e seus limites das seguintes categorias de alimentos 8: Carne e Produtos Cárneos**. Brasília, 2006.

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

BUGLASS, A. J. **Handbook of alcoholic beverages: technical, analytical and nutritional aspects**. Chichester: John Willey & Sons, 2011. 1185p.

BUGLASS, A. J.; CAVEN-QUANTRILL, D. J. Analytical Methods. In: BUGLASS, A. J. **Handbook of Alcoholic Beverages: technical, analytical and nutritional aspects**. Chichester: John Willey & Sons, 2011, 629-932.

CÁDENES, L. et al. Determination of n-nitrosodimethylamine by HPLC, with fluorescence detection. A survey of n-nitrosodimethylamine in commercial beers. **Journal of liquid chromatography & related Technologies**, v. 25, n. 6, p. 977–984, 2002.

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

CERVBRASIL. Associação brasileira da indústria da cerveja. **Anuário 2016**. Disponível em:
<<http://www.cervbrasil.org.br/paginas/index.php?page=dados-do-setor>>
Acesso em: 18 jan. 2017

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**, v. 20, n.5, p. 512-518, 1997.

COSTA, A. C. O. et al. Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis—Optimization of the method with inspection of ionic mobilities. **Journal of Chromatography A**, v. 1204, p. 123–127, 2008.

COSTA, A. C. O. et al. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1171, p. 140–143, 2007.

CREWS, C. The determination of N- nitrosamines in food. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 2, n. 1, p. 2–12, 2010.

DALLAGO, R. M. et al. Determinação de bromato em melhoradores de farinha por cromatografia de troca iônica com detecção espectrofotométrica. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 716-718, 2005.

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**, v. 122, p. 23-29, 2014.

DIVJAK, B.; NOVIC, M.; GOESSLE, W. Determination of bromide, bromate and other anions with ion chromatography and an

inductively coupled plasma mass spectrometer as element-specific detector. **Journal of Chromatography A**, v. 862, n. 1, p. 39–47, 1999.

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

ELLISSON, S. L. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. Guia EURACHEM / CITAC **Determinando a incerteza na medição analítica**. 2002.

EUROPEAN COMMISSION. 2006. Directive 2006/52/EC of the european parliament and of the council of 5 July 2006 **Official Journal of the European Union**, 2006.

FDA. Food additive status list. 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditiveIngredients/ucm091048.htm>> Acesso em: 24 set. 2015.

FDA. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. Potassium bromate. 2015. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=172.730>> Acesso em: 22 ago. 2016.

FIDLER, R. N.; FOX, J. B. J. Comparison of sample preparation procedures for colorimetric analysis of nitrite in frankfurters. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 61, n. 5, p. 1063–1069, 1978.

FISCHER, J.; JANDERA, P. General Aspects of Instrumentation. In: PYELL, U. **Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation and Applications**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006, 235-262.

FOX, J. B.; DOERR, R. C.; LAKRITZ, L. Interaction between sample preparation techniques and three methods of nitrite determination. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 65, n. 3, p. 690–695, 1982.

FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. **Capillary Electrophoresis for Food Analysis: Method development**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000.

GALLART-MATEU, D. et al. Ion mobility spectrometry as a fast analytical tool in benzalkonium chloride homologs determination. **Talanta**, v. 64, p. 110–115, 2017.

GAŁUSZKA, A. et al. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 61–72, 2012.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GARCÍA, C. D.; CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; CARRILHO, E. **Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis: Principles, Applications, and Limitations**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2013. 416 p.

GARCÍA-RUIZ, C.; MARINA, M. L. Capillary electrophoresis in food analysis. In: ÖTLEŞ, S. **Handbook of food analysis instruments**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 403–421.

GAŠ, B. et al. PeakMaster - A freeware simulator of capillary zone electrophoresis. **LC GC EUROPE 18**, v. 5, p. 282–288, 2005.

GAUDRY, A. J. et al. On-line simultaneous and rapid separation of anions and cations from a single sample using dual-capillary sequential injection-capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 781, p. 80–87, 2013.

GEIGER, M.; HOGERTON, A. L.; BOWSER, M. T. Capillary Electrophoresis. **Analytical chemistry**, v. 84, p. 577–596, 2012.

GEISER, L.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J-L. Decreasing analysis time in capillary electrophoresis: Validation and comparison of quantitative performances in several approaches. **Electrophoresis**, v. 26, p. 2293–2302, 2005.

GEISER, L.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J-L. Validation of capillary electrophoresis – mass spectrometry methods for the analysis of a

pharmaceutical formulation. **Electrophoresis**, v. 24, p. 3049–3056, 2003.

GLATZ, Z. Application of short-end injection procedure in CE. **Electrophoresis**, v. 34, 631–642, 2013.

GONÇALVES FILHO, L. C.; MICKE, G. A. Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 477–480, 2007.

GRIES, T. et al. Feasibility of using capillary zone electrophoresis with photometric detection for the trace level detection of bromate in drinking water. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 11, p. 1318–1327, 2008.

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

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. xvii, [12] 898 p.

HONIKEL, K. O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, v. 78, p. 68-76, 2008.

IARC, Internacional Agency for Research on Cancer. **Press Release n° 240**. Disponível em: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240_E.pdf> Acesso em: 12 nov. 2015.

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> Acesso em: 28 Ago. 2016.

ISO. 2918:1975 - Determination of nitrite content. 1975a.

ISO. 3091:1975 - Determination of nitrate content. 1975b.

JAROŠ M. et al. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3080-3085, 2004.

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

JECFA. Sodium nitrate. Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>> Acesso em: 03 nov. 2015a.

JECFA. Sodium nitrite. Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>> Acesso em: 03 nov. 2015b.

KALJURAND, M.; KOEL, M. Recent Advancements on Greening Analytical Separation. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 41, p. 2–20, 2011.

KETAI, W. et al. Determination of bromate in bread additives and fours by flow injection analysis. **Food Chemistry**, v. 70, p. 509-514, 2000.

KHAN, M. R. et al. Quantitative analysis of bromate in non-alcoholic beer using ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, n. 12, p. 4038-4045, 2014.

KOEL, M.; KALJURAND, M. Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry. **Pure and applied chemistry**, v. 78, n. 11, p. 1993–2002, 2006.

KOUTSOUMANIS, K. P.; GEORNARAS, I; SOFOS, J. N. Microbiology of land Muscle foods. In: HUI, Y. H. **Handbook of food science, technology and engineering**, v. 1. Boca Raton: Taylor e Francis Group. 2006. 3618 p.

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

LÓDEN, H. et al. Quantitative determination of salbutamol in tablets by multiple-injection capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1207, p. 181–185, 2008.

LOPEZ, C. et al. A convenient approach to simultaneous analysis of a pharmaceutical drug and its counter-ion by CE using dual-opposite end injection and contactless conductivity detection. **Chromatographia**, v. 75, p. 25–32, 2012.

LOPEZ-MORENO, C.; PEREZ, I. V.; URBANO, A. M. Development and validation of an ionic chromatography method for the determination of nitrate, nitrite and chloride in meat. **Food Chemistry**, v. 194, p. 687–694, 2016.

MAGNUSSON, B.; ORNEMARK, U. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**, 2. ed. [s.l.: s.n.].

MARÁK, J. et al. On-line capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis analysis of bromate in drinking waters in an automated analyzer with coupled columns and photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1267, p. 252–258, 2012.

MARWAHA, K. **Control and analysis for food and agricultural products**. New Delhi: Gene tech books, 2010, 272 p.

MAYER, B. X. How to increase precision in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 907, p. 21–37, 2001.

MAIER, E.; QUEVAUVILLER, P. Interlaboratory studies. In: **Interlaboratory Studies and Certified Reference Materials for Environmental Analysis**. The BCR Approach. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 1999. p. 481–535.

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

MERINO, L. et al. Liquid Chromatographic Determination of Residual Nitrite/Nitrate in Foods: NMKL Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 2, p. 365-376, 2000.

MERUSI, C. et al. Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent

electroosmotic flow reversal. **Food Chemistry**, v. 129, p. 615–620, 2010.

MEYER, V. R. Measurement uncertainty. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1–2, p. 15–24, 2007.

MICHALSKI, R.; ŁYKO, A. Bromate Determination: State of the Art. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 100–122, 2013.

MOHAMED, H. M. Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p. 176–192, 2015.

MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v. 54, n. 5, p. 785–803, 2001.

OETTERER, M. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. 612 p.

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**, v. 3, p. 484–490, 2012.

OSHA. **Hazard Communication Pictograms**. Disponível em: <https://www.osha.gov/dsg/hazcom/pictograms> Acesso em: 17 jan. 2017.

OTHMAN, A. A.; AL-ANSI, S. A.; AL-TUFAIL, M. A. Determination of Bromate in Bottled Drinking Water from Saudi Arabian Markets by HPLC/ICP-MS. **Analytical Letters**, v. 43, n. 5, p. 886–891, 2010.

OYEKUNLE, J. A. O. et al. Bromate and trace metal levels in bread loaves from outlets within Ile-Ife Metropolis, Southwestern Nigeria. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 224–230, 2014.

ÖZTEKIN, N.; AYDIN, H. M.; ERIM, F. B. Stacking in CE for analysis of bromate flour additive. **Chromatographia**, v. 70, n. 5, p. 987–990, 2009.

- ÖZTEKIN, 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.
- 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**, v. 5, p. 637–642, 2012.
- PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, v. 165, p. 216–224, 2007.
- PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. **Handbook of brewing**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 829 p.
- RAMOS, L. A. et al. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114–1120, 2006.
- REDDY-NOONE, K.; JAIN, A.; VERMA, K. K. Liquid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for the determination of bromate, iodate, bromide and iodide in high-chloride matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, p. 145–151, 2007.
- RINCÓN, F. et al. The roles of pH extraction and colloidal protein solubility in the optimization of spectrophotometric nitrite determination in meat products via response surface methodology. **Meat Science**, v. 80, p. 744–752, 2008.
- RINCÓN, F.; MARTÍNEZ, B.; DELGADO, J. M. Detection of factors influencing nitrite determination in meat. **Meat Science**, v. 65, p. 1421–1427, 2003.
- RIZELIO, V. M. et al. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples. **Talanta**, v. 93, p. 62–66, 2012.
- RUIZ-CAPILLAS, C.; ALLER-GUIOTE, P.; JIMENEZ-COLMENERO, F. Application of flow injection analysis to determine protein-bound nitrite in meat products. **Food Chemistry**, v. 101, p. 812–816, 2007.

SÁIZ, J. et al. Simultaneous separation of cations and anions in capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 162–172, 2014.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N. et al. Pressurized hot water extraction followed by miniaturized membrane assisted solvent extraction for the green analysis of alkylphenols in sediments. **Journal of Chromatography A**, v. 1383, p. 8–17, 2015.

SANTAMARIA, P. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 1, p. 10-17, 2005.

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

SEN, N.; LEE, Y. C.; MCPHERSON, M. Comparison of two extraction procedures for recovering nitrite from cured meat products. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 62, n. 5, p. 1186–1188, 1979.

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**, 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**, v. 26, p. 259–266, 2012.

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

SPUDEIT, D. A. et al. A systematic procedure to develop a capillary electrophoresis method using a minimal experimental data. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 27, n. 11, p. 1974-1979, 2016.

- SWINNEY, K.; BORNHOP, D. J. Detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1239-1250, 2000.
- TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 9, p. 173-181, 1996.
- TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, 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**, 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**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.
- TOBISZEWSKI, M.; BIGUS, P.; NAMIEŚNIK, J. Determination of parent and methylated polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction-two dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, p. 6678-6687, 2014.
- TOBISZEWSKI, M. Metrics for green analytical chemistry. **Analytical Methods**, v. 8, p. 2993–2999, 2016.
- TOBISZEWSKI, M. et al. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 943–951, 2009.
- USHER, C. D.; TELLING, G. M. Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: A critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 26, n. 11, p. 1793–1805, 1975.
- VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010. xxvii, 461 p.
- VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.;

VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni (Coord.). **Bebidas não alcoólicas**: ciência e tecnologia. São Paulo: Blucher, 2010.

VEUTHEY, J.; GEISER, L.; RUDAZ, S. Electromigration separation techniques in pharmaceutical analysis. In: PYELL, U. **Electrokinetic Chromatography**: Theory, Instrumentation and Applications. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006, 353-371.

VISTUBA, J. P. et al. Sub-minute method for simultaneous determination of aspartame, cyclamate, acesulfame-K and saccharin in food and pharmaceutical samples by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1396, p. 148–152, 2015.

VITALI, L. et al. Using multiple short-end injections to develop fast electrophoretic separations – Application in iodide analysis. **Journal of chromatography A**, 1218, p.4586-4591, 2011.

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**, v. 1218, 2327–2333, 2011.

WEINBERGER, R. Methods Development for Capillary Electrophoresis with Emphasis on Small Molecules. In: RATHORE, A. S.; GUTTMAN, A. **Electrokinetic Phenomena**: Principles and Applications in Analytical Chemistry and Microchip Technology. New York: Mark Dekker, 2005, 15-42.

WEISS, J. et al. Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, p. 196–213, 2010.

WHATLEY, H. Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis. In: PETERSEN, J. R.; MOHAMMAD, A. A. **Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis**. Totowa: Humana Press Inc. 2001, 21-58.

WHO. (2011). Guidelines for Drinking-water Quality. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf> Acesso em: 15 de dez. 2015.

YAN, Z. et al. Chemiluminescence determination of potassium bromate in flour based on flow injection analysis. **Food Chemistry**, v. 190, 20–24, 2016.

YEHIA, A. M.; MOHAMED, H. M. Green approach using monolithic column for simultaneous determination of coformulated drugs. **Journal of Separation Science**, v. 39, p. 2114-2122, 2016.

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

ANEXO A – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Meat Science 119 (2016) 62–68



Contents lists available at ScienceDirect

Meat Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meatsci

A sub-minute CZE method to determine nitrate and nitrite in meat products: An alternative for routine analysis



Fabiana Della Betta^a, Laís Morilla Pereira^a, Mariana Araújo Siqueira^a, Andressa Camargo Valesse^{a,b}, Heitor Daguer^b, Roseane Fett^a, Luciano Vitali^c, Ana Carolina Oliveira Costa^{a,*}

^a Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, 88034-001 Florianópolis, SC, Brazil

^b Nacional Agriculture Laboratory, Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, 88102-600 São José, SC, Brazil

^c Chemistry Department, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2016

Received in revised form 1 April 2016

Accepted 11 April 2016

Available online 13 April 2016

Keywords:

Sub-minute method

Routine analysis

Meat products

Analytical validation

Uncertainty measurement

ABSTRACT

A sub-minute capillary zone electrophoresis (CZE) method was optimized and a simple sample preparation procedure based on the extraction of the analytes with water and sodium tetraborate was developed for the simultaneous determination of nitrate and nitrite levels in meat products. The background electrolyte (BGE) was composed of 20 mmol L⁻¹ perchloric acid and 65 mmol L⁻¹ β-alanine at pH 3.83. Thiocyanate was used as the internal standard. The proposed method was validated and the uncertainty estimated according to Eurachem guidelines. The run time was only 30 s, allowing analyzing more than 25 samples/h, the good analytical performance confirms the suitability of the method for the analysis of meat products. One sample presented residual nitrite levels above the limit established by MERCOSUL legislation (150 mg kg⁻¹). The use of a fast method in association with a simple sample preparation step means that this procedure represents a possible alternative to fulfill the demand for high throughput in routine laboratory analysis.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nitrate and nitrite have been used for centuries in meat curing where they play important roles as food additives (Cammack et al., 1999; Weiss, Gibis, Schult, & Salminen, 2010), and its effectiveness is well documented; however, the safety of their use has been contested because of toxicological aspects. Nitrate is relatively non-toxic (IDA 3.7 mg kg⁻¹ bw⁻¹) but it can be reduced to nitrite, which in high levels can be toxic and even lethal (IDA 0.06 mg kg⁻¹ bw⁻¹) (Santamaria, 2006). The principal toxic effect of nitrite is the oxidation of hemoglobin to methemoglobin, a compound incapable of transporting oxygen in the blood, leading to a condition known as methemoglobinemia, which is particularly dangerous in newborn infants (Cammack et al., 1999; Santamaria, 2006). Another aspect of concern related to nitrite is the potential to form N-nitrosamines, compounds formed by the nitrosation of primary and secondary amines, which can be carcinogenic (Ferguson, 2010; Hsu, Arcot, & Alice Lee, 2009; Sindelar & Milkowski, 2012).

Recently, WHO's International Agency for Research on Cancer (IARC) classified the consumption of processed meat as carcinogenic to humans (Group 1), based on sufficient evidence in humans that the consumption of processed meat causes colorectal cancer. The experts concluded that each 50 g portion of processed meat eaten daily increases the risk of colorectal cancer by 18% (IARC, 2015). The above-

cited N-nitrosamines are one of the reasons of the carcinogenicity of these processed meats.

The European Commission (EC) establishes nitrate levels in non-heated products as 150 mg kg⁻¹, but in some products higher values are allowed (e.g., bacon and Jamón 250 mg kg⁻¹), and nitrite is limited to 150 mg kg⁻¹ with some exceptions (e.g., dry cured ham 100 mg kg⁻¹, Wiltshire bacon 175 mg kg⁻¹) (Commission, 2006). The Brazilian Ministry of Agriculture and Livestock (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Portuguese acronym MAPA) determines that the maximum allowable levels of nitrate and nitrite in Brazilian meat products are 300 mg kg⁻¹ and 150 mg kg⁻¹, respectively (Brasil, 2006). Based on MERCOSUL legislation, MAPA has also established that when nitrate and nitrite are used simultaneously in meat curing, the results should be expressed as residual nitrite and the maximum allowable value is 150 mg kg⁻¹ (Brasil, 2009).

The determination of nitrate and nitrite in meat products is part of the routine analysis of meat products for quality control, and the most common procedures performed are the AOAC and ISO official methods. Both of these methods are based on the Griess reaction, but in the ISO method, Carrez I (potassium ferrocyanide) and Carrez II (zinc acetate) are used for the deproteinization (AOAC, 2005; ISO, 1975a, 1975b).

The above-mentioned AOAC and ISO official methods have many characteristics, which are undesirable considering the large numbers of samples associated with routine analysis, and especially with regard to the sample preparation step. This step is laborious and time-consuming (with only one analyte being determined at a time),

* Corresponding author.

E-mail address: ana.costa@ufsc.br (A.C.O. Costa).