

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA**

Rafael Vanderson Gomes Manoel

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO
DE CÁTIOS INORGÂNICOS EM LEITES, NITRITO E NI-
TRATO EM ALFACE E HISTAMINA EM PEIXES UTILIZAN-
DO ELETROFORESE CAPILAR**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Química da Uni-
versidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em
Química
Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu
Micke

Florianópolis

2011

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE EQUAÇÕES	15
LISTA DE ABREVIATURAS	17
APRESENTAÇÃO	19
RESUMO	20
ABSTRACT.....	22
CAPÍTULO 1	24
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. OBJETIVO.....	24
3. ELETROFORESE CAPILAR.....	25
4. ELETROFORESE CAPILAR EM SOLUÇÃO LIVRE	27
5. SOLUÇÕES TAMPÃO	29
6. ADITIVOS.....	31
7. FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO	32
8. CURVA DE CALIBRAÇÃO E LINEARIDADE.....	32

9.	LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	33
10.	PRECISÃO	33
11.	PEAKMASTER	33
12.	STATISTICA	34
13.	REFERÊNCIAS	35

CAPÍTULO 2 (DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE CÁTIOS INORGÂNICOS MAJORITÁRIOS EM LEITE BOVINO E LEITE DE SOJA POR ELETROFORESE CAPILAR)..... **37**

1.	INTRODUÇÃO	37
2.	OBJETIVO	38
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1.	Instrumentação e condições do método	38
3.2.	Soluções	39
3.3.	Amostras e processo de extração	39
3.4.	Software	40
3.5.	Figuras de mérito do método	40
	3.5.1. Curva de calibração.....	40
	3.5.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)...	40
	3.5.3. Precisão.....	40
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1.	Desenvolvimento do método	41

4.2. Figuras de mérito	43
4.2.1. Curva de calibração, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	43
4.2.2. Precisão	44
4.2.3. Análise das amostras de leite	45
5. CONCLUSÃO	47
6. REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO 3 (DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO E NITRATO EM ALFACE).....	51
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. OBJETIVO	52
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1. Equipamentos	53
3.2. Reagentes e soluções.....	53
3.3. Software	53
3.4. Amostras	53
3.5. Preparo das amostras	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Verificação da mobilidade iônica.....	54
4.2. Escolha dos constituintes do eletrólito de corrida	58
4.3. Figuras de mérito	61
4.3.1. Eletroferogramas.....	61

4.3.2.	Faixa linear.....	61
4.3.3.	Limite de detecção (LQ) e limite de quantificação (LD)	62
4.3.4.	Aplicabilidade	62
4.3.5.	Resultados das amostras.....	63
5.	CONCLUSÃO	64
6.	REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO 4 (DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PEIXES E CRUSTÁCEOS COMERCIALIZADOS EM FLORIANÓPOLIS)		
..... 69		
1.	INTRODUÇÃO	69
2.	OBJETIVO	70
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
3.1.	Instrumentação.....	70
3.2.	Soluções	71
3.3.	Determinação da mobilidade eletroforética da histamina	71
3.4.	Amostras e processo de extração.....	72
3.5.	Software.....	72
3.6.	Figuras de mérito.....	72
3.6.1.	Curva de calibração, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	72
3.6.2.	Precisão	73
3.6.3.	Exatidão.....	73
3.6.4.	Seletividade	73
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74

4.1. Determinação da Mobilidade Iônica	74
4.2. Desenvolvimento do método.....	75
4.3. Padrão interno (P.I.).....	76
4.4. Otimização do processo de extração.....	77
4.5. Validação do método.....	80
4.5.1. Curva analítica, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	81
4.5.2. Precisão.....	81
4.5.3. Exatidão	81
4.6. Resultados das amostras.....	82
4.7. Comparação com o procedimento adotado no método oficial (fluorimétrico)	83
5. CONCLUSÃO	84
6. REFERÊNCIAS.....	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS	87

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. FORMAÇÃO E SENTIDO DO FLUXO ELETROSMÓTICO NORMAL.....	26
FIGURA 2. PERFIL DO FLUXO PRESSURIZADO (LAMINAR) E DO ELETROSMÓTICO (LINEAR).....	27
FIGURA 3. ESQUEMA DE UM EQUIPAMENTO DE ELETROFORESE CAPILAR.....	28
FIGURA 4. CURVAS CONSTRUÍDAS UTILIZANDO O SOFTWARE PEAKMATER®	41
FIGURA 5. ELETROFEROGRAMAS DOS CÁTIONS ESTUDADOS EM (A) SIMULAÇÃO UTILIZANDO O SOFTWARE PEAKMASTER® E (B) CONDIÇÕES EXPERTIMENTAIS DOS PADRÕES EM ÁGUA.....	43
FIGURA 6. ELETROFEROGRAMAS: I – AMOSTRA LEITE (VACA). II – AMOSTRA LEITE (SOJA). III – PADRÕES 6 MG L⁻¹ (P.I. 10 MG L⁻¹).....	45
FIGURA 7. CURVA DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA VERSUS O INVERSO DO TEMPO DE MIGRAÇÃO DOS ANALITOS ESTUDADOS, COM O NITRITO DESTACADO FORA DA RETA.....	57
FIGURA 8. VARIAÇÃO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA EM FUNÇÃO DO PH PARA OS ÂNIONS ESTUDADOS, PADRÕES INTERNOS POSSÍVEIS E CO-ÍON UTILIZADO NO ELETRÓLITO DE CORRIDA.....	59

FIGURA 9. ELETROFEROGRAMAS DOS TRÊS COMPOSTOS ESTUDADOS EM (I) SIMULAÇÃO UTILIZANDO O *SOFTWARE* PEAKMASTER® COM OS VALORES DE MOBILIDADE DISPONÍVEIS EM SUA BIBLIOTECA DE DADOS, EM (II) SIMULAÇÃO UTILIZANDO O *SOFTWARE* PEAKMASTER® COM OS VALORES DE MOBILIDADE DETERMINADOS ATRAVÉS DA CURVA CONSTRUÍDA E EM (III) CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DOS PADRÕES EM ÁGUA..... 60

FIGURA 10. ELETROFEROGRAMAS: I – AMOSTRA. II – PADRÕES. 1 = IODETO (P.I.). 2 = NITRITO. 3 = NITRATO. 62

FIGURA 11. QUANTIDADE DE NITRATO, EM MASSA FRESCA, ENCONTRADO NAS AMOSTRAS COM A VARIAÇÃO DE TEMPO DE COLETA. 64

FIGURA 12. CURVAS DE MOBILIDADE EFETIVA *VERSUS* PH 75

FIGURA 13. ELETROFEROGRAMA DA AMOSTRA 9 MG L⁻¹ DE HISTAMINA EM ETANOL/ÁGUA. 1 = IMIDAZOL (P.I.). 2 = HISTAMINA..... 77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. SISTEMAS TAMPÃO COMUMENTE USADOS EM ELETROFORESE CAPILAR (TAVARES, 1997).	30
TABELA 2. ADITIVOS DE ELETRÓLITO COMUMENTE EMPREGADOS EM ELETROFORESE CAPILAR (TAVARES, 1997).	31
TABELA 3. FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO PROPOSTOS.	44
TABELA 4. CONCENTRAÇÃO DOS CÁTIONS ANALISADOS NAS SEIS AMOSTRAS OBITIDAS.	46
TABELA 5. VALORES DE MOBILIDADE (LITERATURA), TEMPOS DE MIGRAÇÃO, TEMPOS DE MIGRAÇÃO MÉDIOS, DESVIO PADRÃO, VARIAÇÃO PERCENTUAL E INVERSO DO TEMPO DE MIGRAÇÃO MÉDIO PARA TODOS OS COMPOSTOS ANALISADOS.	55
TABELA 6. FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO PROPOSTOS.	61
TABELA 7. MISTURA CONTENDO (% M/M), PPM NITRATO EM MASSA FRESCA DAS AMOSTRAS DE ALFACES ANALISADAS, PARA AS DIFERENTES CONSTITUIÇÕES DE SOLUÇÃO NUTRITIVA.	63
TABELA 8. ÁREA OBTIDA PARA OS DIFERENTES SOLVENTES DE EXTRAÇÃO DA AMOSTRA.	78
TABELA 9. ÁREA OBTIDA PARA OS DIFERENTES TEMPOS DE EXTRAÇÃO DA AMOSTRA COM E SEM AQUECIMENTO.	79

TABELA 10. ÁREA OBTIDA PARA OS DIFERENTES TEMPOS DE EXTRAÇÃO DA AMOSTRA.....	80
TABELA 11. FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO PROPOSTOS.	80
TABELA 12. DADOS OBTIDOS A PARTIR DA RECUPERAÇÃO DA HISTAMINA NA AMOSTRA DE ATUM.	82
TABELA 13. VALORES ENCONTRADOS PARA AS ANÁLISES NAS DIFERENTES MATRIZES.....	83
TABELA 14. COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO FLUORIMÉTRICO E O MÉTODO PROPOSTO POR ELETROFORESE CAPILAR.....	83

LISTA DE EQUAÇÕES

$$\mathbf{V} = (\mathbf{MEF} + \mathbf{MEO}) \mathbf{E} \quad (1) \dots\dots\dots 18$$

$$(\mathbf{M}_{EF})_I = \Sigma (\mathbf{M}_J \mathbf{A}_J) \quad (2) \dots\dots\dots 18$$

$$\mu_{\text{eff},A^-} = \left(\frac{\mu_{\text{act},A^-}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \right) \quad (3) \dots\dots\dots 29$$

$$\mu = \frac{Lxl}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right) \quad (4) \dots\dots\dots 56$$

$$\mu_{\text{ep}} = \mu_{\text{eff}} - \left(\frac{Z}{Z_{\text{no pH do BGE}}} \right) \quad (5) \dots\dots\dots 56$$

$$\mu_{\text{abs}} = \frac{\left(\mu_{\text{ep}} + \left(Z \cdot B_2 \cdot \left(\frac{\sqrt{IS}}{1 + 1,5\sqrt{IS}} \right) \right) \right)}{\left(1 - B_1 \cdot \left(\frac{q}{1 + \sqrt{q}} \right) \cdot \left(\frac{\sqrt{IS}}{1 + 1,5\sqrt{IS}} \right) \right)} \quad (6) \dots\dots\dots 56$$

$$\frac{1}{t_m} = \left(1 - B_1 \cdot \left(\frac{q}{1 + \sqrt{q}} \right) \cdot \left(\frac{\sqrt{IS}}{1 + 1,5\sqrt{IS}} \right) \right) \cdot \frac{V}{Lxl} \mu_{\text{abs}} - \left(Z \cdot B_2 \cdot \left(\frac{\sqrt{IS}}{1 + 1,5\sqrt{IS}} \right) \right) \cdot \frac{V}{Lxl} + \frac{1}{t_0} \quad (7) \dots\dots\dots 56$$

$$\mu_{\text{eff},A^-} = \frac{\mu_{\text{act},A^-}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (8) \dots\dots\dots 74$$

$$\mu_{eff,A^-} \cong \mu_{act,A^-} \quad (9) \dots\dots\dots 74$$

$$\mu_{act,A^-} = \mu_{0,A^-} - \left[\frac{159,36}{\varepsilon_r^{3/2}} \mu_{0,A^-} + \frac{0,2476 \times 10^{-5}}{\eta \varepsilon_r^{1/2}} \right] \sqrt{I} \quad (10) \dots\dots\dots 74$$

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectroscopia de absorção atômica (AAS)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Bas	Aminas Biogênicas
BGE	Eletrólito de corrida
CE	Eletroforese capilar (CE)
CEC	Eletrocromatografia capilar
CGE	Eletroforese capilar em gel (CGE)
CIEF	Focalização isoeletrica capilar
CITP	Isotacoforese capilar
CZE	Eletroforese capilar de zona (CZE)
DP	Desvio padrão
DPR%	Desvio padrão relativo
E	Campo elétrico
EHS	Extrato hidrossolúvel de soja
EMD	Efeitos de dispersão por eletromigração
EOF	Fluxo eletrosmótico (EOF)
GC	Cromatografia gasosa (GC)
HEXA	Brometo de hexano-1,6-bis(trimetilamônio)
HIBA	Ácido 2-hidroxi isobutílico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)
I	Força iônica
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e
Qualidade Industrial	
IS	Força iônica
<i>l</i>	Comprimento até a janela de detecção
<i>L</i>	Comprimento do capilar
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MECK	Cromatografia eletrocínética micelar (MECK)
OMA of AOAC	Official Methods of Analysis of AOAC INTER-
NATIONAL	
PI	Padrão interno
<i>t_m</i>	Tempo de migração do analito
<i>t₀</i>	Tempo de migração do fluxo
TRIS	Tris-metilaminometano
v	Velocidade
V	Voltagem
Z	Carga do composto
Z_{no ph do BGE}	Carga do composto no ph do eletrólito de corrida

α_j	Fração molar ou função de distribuição
ϵ_r	Constante dielétrica
η	Viscosidade
μ_{0,A^-}	Mobilidade iônica de A^-
μ_{abs}	Mobilidade absoluta
μ_{act,A^-}	Mobilidade real
μ_{ef}	Mobilidade efetiva do analíto
μ_{eff,A^-}	Mobilidade efetiva (real) do analíto
μ_{eo}	Mobilidade efetiva do fluxo
μ_{ep}	Mobilidade eletroforética
μ_i	Mobilidade iônica
μ_j	Mobilidade iônica de cada espécie indivi-
dual j	

APRESENTAÇÃO

A análise de alimentos assume importância crescente em face de demandas públicas por alimentos seguros, de alta qualidade e composição conhecida, fatores assegurados através da legislação que depende fortemente de métodos analíticos adequados para detectar a contaminação e adulteração de forma rápida e confiável. Recentemente a eletroforese capilar (CE) vem se mostrando uma técnica de separação útil e poderosa, devido sua grande flexibilidade e versatilidade, mas a sua aplicação para análise de alimentos tem sido limitada, ficando quase sempre fora dos livros de métodos oficiais. Visando esta deficiência, este trabalho se propôs a desenvolver métodos por CE para a análise de cátions em leites, nitrito e nitrato em alfaces e histamina em peixes e crustáceos, além da proposta de um novo método para determinação da mobilidade eletroforética. Ele é apresentado em 4 capítulos, sendo o primeiro um resumo com a fundamentação teórica, além de equações, termos e softwares utilizados. Nos capítulos seguintes é apresentado o desenvolvimento de cada método de análise e suas justificativas, os resultados obtidos para cada parâmetro estudado e uma demonstração da aplicação de cada método. As principais vantagens apresentadas pelos métodos desenvolvidos foram o tempo reduzido, com tempos de análises inferiores a 1,5 minutos, e o baixo custo por análise, além do consumo reduzido de solventes.

RESUMO

O primeiro capítulo pretende descrever a fundamentação teórica inerente a eletroforese capilar (CE) aplicada à análise de alimentos, de forma a facilitar o entendimento do restante da dissertação. Procura-se também esclarecer algumas equações, que descrevem o fluxo eletrosmótico, definições de termos usuais como solução tampão e aditivos, além de termos de validação de métodos como linearidade, curva de calibração, limite de detecção, limite de quantificação e precisão. Há também uma descrição básica dos programas Peakmaster[®], utilizado na otimização dos parâmetros necessários à obtenção de separações adequadas, e Statistica[®], utilizado no tratamento estatístico dos dados obtidos nas diversas análises realizadas. Nele também se encontram conceitos básicos para alguns termos de validação de métodos, além dos tratamentos estatísticos utilizados. Já o capítulo 2 tem como objetivo desenvolver um método por eletroforese capilar (CE) para comparar quantidades de potássio, sódio, cálcio e magnésio entre leites de soja e de vaca, utilizando o software Peakmaster[®] como ferramenta de otimização auxiliar dos parâmetros de separação. Nos resultados obtidos pôde-se observar uma eficiente separação dos analitos em menos de 1,5 minutos. A faixa linear da curva de calibração para ambos os analitos foi de 2 - 10 mg L⁻¹. Os valores de R² foram 0,997 para o potássio; 0,982 para o cálcio; 0,998 para o sódio e 0,999 para o magnésio. Todas as amostras de Leite apresentaram concentração entre 1126 e 1826 mg L⁻¹ para o potássio, 739 a 1023 mg L⁻¹ para o sódio, 1097 a 1422 mg L⁻¹ para o cálcio e 253 a 289 mg L⁻¹ para o magnésio. O método desenvolvido mostrou-se simples, rápido e eficiente para a determinação de cátions inorgânicos em diferentes matrizes de leite, com um simples pré-tratamento da amostra. Para o capítulo 3, o objetivo foi o desenvolvimento de um método rápido para análise de nitrato e eventualmente nitrito, buscando facilidade operacional, robustez e baixa geração de resíduos, para sua utilização em análises de rotina. Após diferenças na resolução obtida para as bandas do nitrito e nitrato entre os dados simulados no software Peakmaster[®] e os obtidos nas análises foi proposto um novo método para determinação de mobilidade eletroforética. Os dados de mobilidade iônica para os ácidos nítrico e nitroso foram verificados utilizando a equação da reta da curva obtida através da corrida eletroforética de uma amostra, realizada em quadruplicata, contendo uma mistura de sete padrões, em um eletrólito Tris/HCl. O método apresentou linearidade igual a 0,9964 e 0,9997 e faixa linear de 10 - 80 mg L⁻¹ e de 70 - 560 mg L⁻¹, para nitrito e nitrato, respectivamente. O tempo total de

corrida foi inferior a 1,5 minutos. Foram analisadas amostras de alface, da variedade mimosa, cultivadas em quatro formulações distintas de solução hidropônica, fornecidas pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis/SC), para determinação de sistema ideal de cultivo e período ideal de colheita das plantas. Ao fim do trabalho, um método simples, rápido e confiável para a determinação de nitrito e nitrato pode ser obtido. No quarto e último capítulo, o objetivo foi desenvolver e validar um método analítico para análises de rotina, alternativo ao método oficial, por eletroforese capilar, para identificação e quantificação de histamina em pescado. O método escolhido para extração teve como base o preparo proposto para o método fluorimétrico, recomendado pela Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, porém com modificações realizadas após estudos em relação ao tempo, solvente e temperatura de extração, visando redução de custos e toxicidade. O método ainda foi validado segundo os parâmetros recomendados pelos órgãos responsáveis no país (ANVISA e INMETRO), dentre eles, linearidade (0,998), repetibilidade (inferior a 2,5%), exatidão (recuperação média de 102%), limite de quantificação (1 mg L^{-1}) e de detecção ($0,3 \text{ mg L}^{-1}$), o tempo de corrida foi inferior a 1 minuto. As principais vantagens apresentadas pelo método desenvolvido foram o tempo reduzido e o baixo custo por análise, além do baixo consumo de solventes, minimizando custos com tratamento de resíduos tornando o método ecologicamente mais correto.

Palavras-chave: eletroforese capilar, mobilidade eletroforética, alimentos.

ABSTRACT

This chapter describes the theoretical inherent to capillary electrophoresis (CE) in order to facilitate the comprising of the dissertation. It also seeks to clarify some equations, which describe the electroosmotic flow, definitions of usual terms as buffer solution and additives, and terms of validation of methods, such as linearity, curve calibration, limit of detection, limit of quantification and accuracy. There is also a basic description of programs Peakmaster[®], used in the optimization of parameters required to obtain adequate separation, and Statistica[®], used in the statistical treatment of data obtained in several tests performed. There are also some basic concepts for terms of validation methods, in addition to the statistical treatments used. Since Chapter 2 aims to develop a method by capillary electrophoresis (CE) to compare amounts of potassium, sodium, calcium and magnesium from soy and cow milk, using the software Peakmaster[®] to optimize the parameters in obtaining appropriate separations. Could be observed in the results an efficient separation of analytes in less than 1.5 minutes. The linear calibration curve for both analytes was 20 to 10 mg L⁻¹. The R² values were 0.997 for potassium, 0.982 for calcium, 0.998 for sodium and 0.999 for magnesium. All samples of milk showed concentrations between 1126 and 1826 mg L⁻¹ to potassium, 739 to 1023 mg L⁻¹ for sodium, from 1097 to 1422 mg L⁻¹ for calcium and 253 to 289 mg L⁻¹ to magnesium. The method proved simple, fast and efficient for the determination of inorganic cations in different samples of milk, with a simple pretreatment of the sample. In chapter 3, the goal was to develop a rapid method for analysis of nitrate and nitrite may, seeking operational simplicity, robustness and low generation of waste, for use in routine analysis. After differences on resolution obtained for the bands of nitrite and nitrate from simulated data in the software Peakmaster[®] and those obtained in this study, we proposed a new method for determination of electrophoretic mobility. The ion mobility data for nitrous and nitric acids were verified using the straight line equation of the curve obtained by electrophoresis from a sample, performed in quadruplicate, containing a mixture of seven standards, in an electrolyte Tris / HCl. The method showed linearity equal to 0.9964 and 0.9997 and linear range from 10 to 80 mg L⁻¹ and 70 to 560 mg L⁻¹ for nitrite and nitrate, respectively. The total running time was under 1.5 minutes. We examined samples of lettuce, mimosa variety, cultivated on four different formulations from hydroponic solution, provided by the Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis / SC) to determine the ideal culture system and ideal har-

vesting time of plants. At the end of work, we obtained a simple, fast and reliable method for the determination of nitrite and nitrate. In the fourth and final chapter, the goal was to develop and validate an analytical method for routine analysis alternative to the official method by capillary electrophoresis for identification and quantification of histamine in fish. The method selected for extraction was based on preparation for the proposed fluorimetric method recommended by the Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, but with modifications made after studies in relation to time, solvent and extraction temperature, aimed at reducing costs and toxicity. The method also was validated according to the parameters recommended by the responsible agencies in the country (ANVISA and INMETRO), among them, linearity (0.998), repeatability (lower than 2.5%), accuracy (average recovery of 102%), limit of quantification (1 mg L^{-1}) and limit of detection (0.3 mg L^{-1}), the running time was lower than 1 minute. The main advantages presented by the developed method were running out of time and low cost per analysis, in addition to the low solvent consumption, reducing residues treatment costs becoming the method more environmentally correct.

Keywords: capillary electrophoresis, electrophoretic mobility, food.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A análise de alimentos assume uma importância crescente em face de demandas públicas por alimentos seguros, de alta qualidade e composição conhecida. A segurança dos alimentos, por exemplo, é assegurada através da legislação que depende fortemente de métodos analíticos adequados para detectar a contaminação e adulteração de forma rápida e confiável. Os alimentos se apresentam como uma difícil matriz e, portanto, torna-se necessário uma vasta gama de técnicas de análise instrumental sensíveis para os inúmeros aspectos para a sua análise química e bioquímica. Métodos cromatográficos como a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são atualmente bastante utilizados na análise de alimentos, porém, a GC não pode analisar compostos não voláteis ou não termoestáveis diretamente e HPLC pode apresentar baixo poder de resolução, além de difícil modificação da seletividade (DONG, 1999). Recentemente a eletroforese capilar vem se mostrando uma técnica de separação útil e poderosa, surgindo como alternativa devido a sua grande flexibilidade e versatilidade, oferecendo alto poder de resolução e pequena demanda de volume de amostra e reagentes (OGURI, 1999; TAVARES, 1996). No entanto, apesar destas aparentes vantagens, a aplicação da CE para análise de alimentos tem sido limitada, ficando quase sempre fora dos livros de métodos oficiais.

2. OBJETIVO

Este capítulo procura descrever, em maior detalhe, a eletroforese capilar de zona, por ser o modo empregado no restante do trabalho. Também irá buscar um maior esclarecimento sobre fatores importantes no desenvolvimento do método como soluções tampão e aditivos, assim como alguns parâmetros de validação, descrição de programas utilizados.

3. ELETROFORESE CAPILAR (CE)

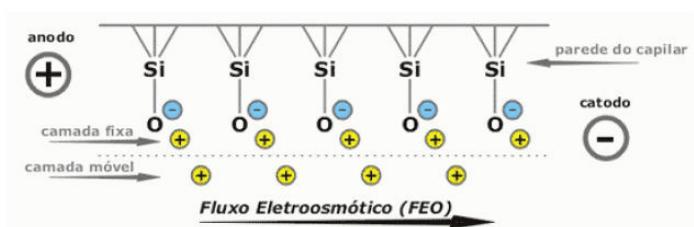
A eletroforese é uma técnica de separação baseada nas diferenças de mobilidade dos analitos quando submetidos à ação de um campo elétrico (SKOOG, 2002). Ela foi introduzida por Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, na década de 30 para o estudo de proteínas no soro sanguíneo e por este trabalho ganhou o prêmio Nobel em 1948, mas a técnica apresentava uma baixa resolução causada principalmente pelo efeito joule (GERVASIO, 2003). Já na década de 70, a técnica foi aperfeiçoada por Jorgenson e Lukacs, com a introdução de um tubo capilar para obtenção de alta eficiência nas separações (JORGENSEN e LUCKACS, 1981, apud: QUEIROZ e JARDIM, 2001). A partir daí houve um rápido avanço até esta ser considerada a terceira grande técnica instrumental de separação e seu rápido avanço se deve, além da simplicidade experimental, pela variedade de modos de separação que podem ser efetuados em uma única coluna capilar e dos compostos passíveis de análise em cada modo (ALTRIA, 1995; ST. CLAIRE, 1996).

Técnicas de eletromigração em capilares têm se mostrado altamente eficientes na separação de íons pequenos, tanto orgânicos como inorgânicos, fármacos, explosivos, corantes, polímeros, proteínas e peptídeos, DNA e RNA, células, partículas, etc (SILVA, 2007).

Em EC, introduz-se uma amostra por uma das extremidades de um capilar, comumente de 15 a 100 μm de diâmetro interno e de 20 a 100 cm de comprimento, preenchido com uma solução tampão (também chamada de eletrólito de corrida) e então é aplicado um potencial para que seja criado um campo elétrico. Este campo influenciará sobre os analitos de forma a migrarem no capilar do ponto de injeção em direção à janela de detecção, onde serão detectados. A maior vantagem no emprego de um tubo capilar é a alta relação entre a área superficial e o volume, facilitando a dissipação de calor produzida pelo efeito joule. Isto permite o emprego de altas voltagens, aumentando a eficiência dos picos (tipicamente acima de 10^5 pratos) e também um curto tempo para as análises (BUSTO, 1995; AVELAR, 2005; GUIMARÃES, 2005).

Outra importante característica da eletroforese capilar é a presença do fluxo eletrosmótico (EOF). O EOF ocorre pela ionização dos grupos silanóis da sílica presente no interior dos capilares quando em contato com o eletrólito de corrida com valor de pH acima de 2. Na superfície do capilar estão dispostos grupamentos dissociados (grupos silanoatos) que conferem carga negativa à parede. Estes grupos silanoatos atraem os prótons H^+ provenientes da solução de corrida formando uma camada interna de cátions (camada fixa) próxima à parede do capilar. Esta ca-

mada não é suficiente para neutralizar todas as cargas negativas da parede do capilar e então se forma uma segunda camada de prótons (camada móvel). No momento em que é aplicado um campo elétrico, a camada móvel é deslocada em direção ao eletrodo de carga oposta. Moléculas de água que solvatam os íons da camada móvel também são transportadas ao longo do capilar, contribuindo para o seu deslocamento, induzindo um fluxo de solução como um todo em direção ao cátodo. Esta força responsável pelo transporte dos analitos, sem distinção de cargas ao longo do capilar é denominada fluxo eletrosmótico. Este fluxo possibilita a análise simultânea de amostras contendo tanto solutos catiônicos quanto solutos aniônicos, e até solutos neutros, embora quanto a estes não haja entre eles uma discriminação temporal (TAVARES, 1996). Quando este movimento se dá do pólo positivo para o pólo negativo denomina-se como sendo um fluxo eletrosmótico normal, como o mostrado na Figura 1.



FONTE: QUEIROZ, JARDIM, 2005.

Figura 1. Formação e sentido do fluxo eletrosmótico normal.

Além de o fluxo ser responsável pela possibilidade da análise simultânea das amostras contendo solutos aniônicos, neutros e catiônicos, também possui vinculado a si parte das características de alta eficiência da técnica, devido ao perfil radial de sua velocidade (Figura 2). Seu perfil radial permite que as moléculas dentro do capilar se movimentem com velocidades muito próximas, independentes de sua posição radial. Esta peculiaridade permite uma maior eficiência na separação dos picos frente aos demais métodos cromatográficos em fase líquida em coluna, que apresentam um fluxo laminar, característico de amostras introduzidas por pressão.

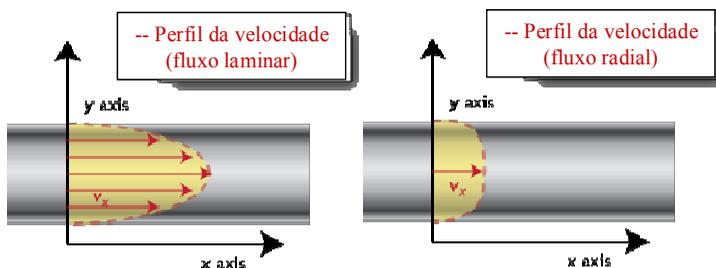


Figura 2. Perfil do fluxo pressurizado (laminar) e do eletrosmótico (linear).

A eletroforese capilar engloba diversas formas de operação com diferentes mecanismos de separação, tendo em comum um mesmo princípio. Entre os principais modos estão: eletroforese capilar de zona (CZE,); cromatografia eletrocinética micelar (MECK); Eletroforese capilar em gel (CGE); focalização isoelétrica capilar (CIEF); isotacoforese capilar (CITP), eletrocromatografia capilar (CEC). A diferença básica entre cada modo de operação se encontra na solução tampão empregada e o preenchimento dentro da coluna. A Figura 3 apresenta o esquema de um equipamento de eletroforese capilar.

4. ELETROFORESE CAPILAR EM SOLUÇÃO LIVRE

Eletroforese capilar de zona ou eletroforese capilar em solução livre é um dos principais modos de separação eletroforética utilizados. Seu mecanismo de separação se baseia nas diferenças de velocidade de migração de espécies iônicas quando submetidas a um campo elétrico devido a sua razão carga/raio iônico.

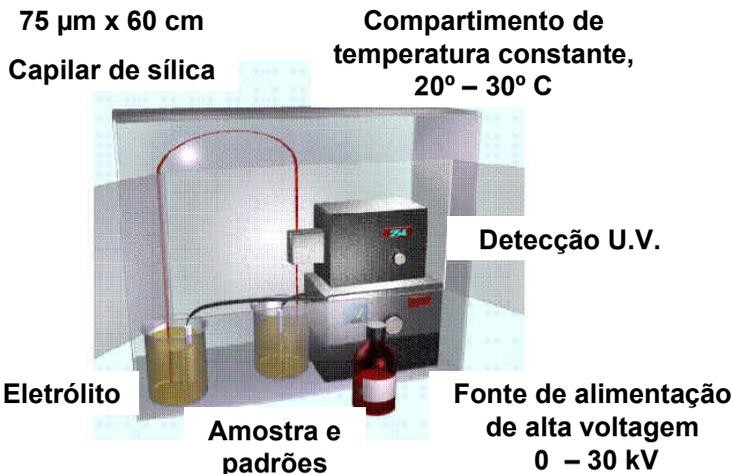


Figura 3. Esquema de um equipamento de eletroforese capilar.

Quando uma espécie carregada eletricamente é exposta a um campo elétrico (E), essa migrará com velocidade (v) característica que é proporcional ao campo elétrico aplicado, Equação 1.

$$v = (\mu_{ef} + \mu_{eo}) E \quad (1)$$

Para soluções de eletrólitos compostos de um ácido ou base fracos, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio, a molécula não ionizada (com mobilidade zero), e a base ou ácido conjugado, cada qual com um valor particular de mobilidade. Assim, da mesma forma que os íons simples são caracterizados por um valor de mobilidade iônica (μ_i), o conceito de mobilidade efetiva é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos. A mobilidade efetiva (μ_{ef}) pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius, na qual qualquer substância i presente em solução em diferentes formas j , relacionadas entre si por um equilíbrio ácido-base rápido, irá migrar em um campo elétrico como um soluto único, possuindo certa mobilidade efetiva dada pela Equação 2.

$$(\mu_{ef})_i = \sum (\mu_j \alpha_j) \quad (2)$$

Onde α_j é a fração molar ou função de distribuição e μ_j a mobilidade iônica de cada espécie individual j .

Um método desenvolvido por eletroforese capilar em solução livre deve satisfazer as seguintes condições: i) o co-íon do eletrólito de corri-

da (componente do eletrólito de corrida com a mesma carga do analito) deve ser escolhido de modo a minimizar os efeitos de dispersão por eletromigração (EMD); ii) o eletrólito otimizado deve apresentar boa capacidade tampicante; iii) as diferenças de mobilidade efetiva devem ser suficientes para uma boa resolução entre os analitos; iv) para se obter uma análise rápida deve-se aplicar um alto campo elétrico.

A partir dos valores de pK_a e μ_i é possível a construção de curvas de mobilidade efetiva para os analitos e para os componentes do eletrólito de corrida utilizando a Equação 2.

A utilização das curvas de mobilidade efetiva versus pH auxilia na escolha do co-íon, escolha do padrão interno, inspeção dos possíveis interferentes e determinação do modo de operação (contra ou co-eletrosmótico).

Outro fenômeno que deve ser evitado em eletroforese capilar é a formação de “system zones”, chamados picos de sistema, próximos ou coincidentes com a zona da amostra, fenômeno esse que pode ser prejudicial à detecção.

5. SOLUÇÕES TAMPÃO

O controle do pH é um fator importante na separação eletroforética pois ele infere diretamente sobre a separação de compostos com caráter ácido-base. Ele influi diretamente no valor da mobilidade efetiva do íon, referente ao produto das mobilidades eletroforéticas das espécies em equilíbrio e a distribuição das concentrações relativas de cada espécie no pH considerado, de acordo com a Equação 3 (TAVARES. 1997).

$$\mu_{\text{eff},A^-} = \left(\frac{\mu_{\text{act},A^-}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \right) \quad (3)$$

Onde μ_{eff,A^-} é igual a mobilidade efetiva do analito e μ_{act,A^-} igual a sua mobilidade real, medida no equipamento.

Desta forma, a escolha de uma solução tampão torna-se necessária, tendo esta implicação direta na otimização da separação. Considerando-se também que o valor do pH tem influência direta na mobilidade do fluxo eletrosmótico, uma solução tampão ideal deve apresentar uma alta capacidade tampicante, aumentando assim a precisão do método obtido. Outra consideração a ser feita se refere à mobilidade do co-íon, que é o composto do sistema tampicante que apresenta a mesma carga dos compostos analisados. Idealmente ele deve apresentar mobilidade igual

ou mais próxima possível do analito, reduzindo assim alargamentos e distorções no perfil do pico eletroforético (MICKÉ, 2006).

Como regra geral, se aplica que os sistemas tampão são eficientes em um intervalo de pH de mais ou menos uma unidade sobre o valor do pKa e na Tabela 1 se encontram os valores de pKa dos tampões mais utilizados em eletroforese capilar.

Tabela 1. Sistemas tampão comumente usados em eletroforese capilar (TAVARES, 1997).

Sistema Tampão	pKa	Sistema Tampão	pKa
Fosfato	2,12	Fosfato	7,21
Citrato	3,06	TES	7,50
Formiato	3,75	HEPES	7,55
Succinato	4,19	HEPPSO	8,00
Citrato	4,74	TRICINA	8,15
Acetato	4,75	Hidrocloreto de amido-glicina	8,20
Citrato	5,40	Glicilglicina	8,25
Succinato	5,57	TRIS	8,30
MES	6,15	BICINA	8,35
ADA	6,60	Morfolina	8,49
BIS-TRIS propano	6,80	Borato	9,24
PIPES	6,80	CHES	9,50
ACES	6,90	CHAPSO	9,60
MOPSO	6,90	CAPS	10,40
Imidazol	7,00	Fosfato	12,32
MOPS	7,20		

ACES: ácido 2-[(2-amino-2-oxoetil)amino] etanossulfônico; ADA: ácido N-[2 acetamido]-2-iminodiacético; BICINA: N,N-bis[2-hidroxietil)amino] etanossulfônico; BIS-TRIS: 1,3-bis[tris(hidroximetil)-metilamino] propano; CAPS: ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanossulfônico; CHAPSO: sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-2-hidroxi-1-propano; CHES: ácido 2-[Nciclohexilamino] etanossulfônico; HEPES: ácido N-2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico; HEPPSO: ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-hidroxi] propanossulfônico; MES: ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico; MOPS: ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico; MOPSO: ácido 3-[N-morfolino]-2-hidroxi propanossulfônico; PIPES: piperazina-N,N'-bis-[ácido etanossulfônico]; TES: ácido N-tris[hidroximetil]metil-2-amino etanossulfônico; TRICINA: N-[2-hidroximetil)etil]-glicina; TRIS:Tris(hidroximetil)amino metano.

Capilares de sílica fundida permitem que se trabalhe em uma faixa de pH que vai de 2 a 12, mas a estabilidade do composto analisado é que vai determinar quais valores podem ser empregados na análise. Altas concentrações do eletrólito reduzem a possível adsorção da amostra na parede interna do capilar, reduzindo possíveis alargamentos e distorções do pico eletroforético, além de melhorar a repetibilidade do método. Porém, com o aumento da concentração do eletrólito condutor ou tampão há um aumento gradual da corrente elétrica, aumentando o efeito joule e comprometendo a separação. Desta forma, estes também são valores que devem ser determinados durante a otimização do método.

6. ADITIVOS

Na eletroforese capilar de zona é comum o uso de aditivos no eletrólito de corrida (solução tamponante) para minimizar a adsorção de compostos com a parede do capilar, facilitar a solubilidade da amostra e/ou alterar a mobilidade dos analitos ou do fluxo eletrosmótico. Uma lista de vários aditivos e seus respectivos efeitos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Aditivos de eletrólito comumente empregados em eletroforese capilar (TAVARES, 1997).

Aditivo	Função e/ou Efeito
Ácidos sulfônicos	Agentes de pareamento iônico e modificadores da carga superficial.
Aminas	Bloqueiam sítios ativos na superfície do capilar. Reduzem adsorção e assimetria de pico.
Anfólitos	Reduzem a interação soluto-capilar, melhoram a resolução e simetria de pico.
Ciclodextrinas	Usados nas separações quirais e como complexantes auxiliares na separação de compostos neutros.
Éter coroa	Usados nas separações quirais e como complexantes auxiliares na separação de metais.
Glicóis	Reduzem a adsorção soluto-capilar, auxiliam na solubilidade de solutos orgânicos e reduzem o fluxo eletrosmótico.
Metais de transição	Modificam a mobilidade de certos solutos, afetam a resolução.
Polímeros de celulose	Agentes modificadores do fluxo eletrosmótico.

Sais inorgânicos	Reduzem o fluxo eletrosmótico, alteram a conformação de proteínas e previnem a adsorção soluto-capilar.
Solventes orgânicos	Aumentam a solubilidade de solutos orgânicos. Reduzem interação soluto-capilar. Agentes modificadores do fluxo eletrosmótico.
Tensoativos catiônicos	Revertem o fluxo eletrosmótico.
Uréia	Aumenta a solubilidade das proteínas.

Neste trabalho, foi utilizado um sal quaternário para reduzir o fluxo eletrosmótico. O brometo de hexano-1,6-bis(trimetilamônio) (HEXA), complexa com a parede interna do capilar, reduzindo o número de grupos silanoatos disponíveis.

7. FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO

O desenvolvimento de um método analítico, adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo é denominado de validação e os termos envolvidos são chamados de figuras de mérito do método (BRITO, 2003). No Brasil, há 2 agências credenciadoras para verificar a competência técnica de laboratórios de ensaios: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária); resolução ANVISA RE nº. 475 de 19/03/2002, e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial); INMETRO DOQ-CGCRE-008 de março/2003 e são eles quem define no país o significado de cada figura, no qual os próximos capítulos se baseiam.

8. CURVA DE CALIBRAÇÃO E LINEARIDADE

Refere-se à relação funcional entre o valor esperado para o sinal ou resposta e a quantidade de analito e se apresenta na forma de um gráfico que relaciona as respostas do equipamento em função de várias concentrações do analito (BARROS, 2005). A linearidade se refere à capacidade da curva em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (SANTANA, 2007).

9. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de detecção refere-se à menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada e pode ser expresso tanto pelo método visual, relação sinal-ruído ou por parâmetros da curva analítica. Já o limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas, e pode ser expresso da mesma forma que o limite de detecção (CURRIE, 1999).

10. PRECISÃO

A precisão se refere à proximidade entre varias medidas, representando assim a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma maneira, com amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Ela pode ser avaliada em até 3 níveis diferentes: precisão intra-ensaio, precisão inter-ensaio e reprodutibilidade. A precisão intra-ensaio ou repetitividade se refere ao grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurado, efetuadas sob as mesmas condições de medição, já na precisão inter-ensaio ou intermediária se dá quando um ou mais fatores importantes são mudados e a reprodutibilidade quando há a colaboração entre outros laboratórios (VIM 1995). Em alguns casos também pode ser avaliada a precisão instrumental, que se refere apenas à precisão do equipamento utilizado.

11. PEAKMASTER

É um software que foi desenvolvido para eletroforese capilar em 2000 por Jaros *et al.* e passou por várias revisões para chegar a versão 5.2 (HRUSKA, 2006). O software utiliza uma série de equações derivadas da teoria para calcular a migração dos analitos em função de determinados parâmetros de entrada. Esses parâmetros de entrada envolvem concentração dos componentes do eletrólito de corrida, pKa e mobilidade iônica de todas as espécies envolvidas na separação. Valores tabelados para uma gama de compostos (~ 400) foram incluídos e podem ser selecionados dentro do programa. Além disso, o usuário pode especificar uma variedade de outros parâmetros, tais como o comprimento capilar (total e efetivo), tensão aplicada, polaridade, presença e mobilidade do

fluxo e o tipo de sinal pode ser escolhido entre condutividade, detecção direta ou detecção indireta. Além disso, a mobilidade pode ser automaticamente ajustada para levar em consideração o efeito da força iônica (JOHNS, 2009). A saída do programa é exibida como um eletroferograma simulado, juntamente com os dados tabulados, incluindo a mobilidade efetiva e tempos de migração para cada analito. Como tal, é possível observar mudanças no eletroferograma através da modificação dos parâmetros do eletrólito. Devido a esta característica do programa Peakmaster torna uma ferramenta útil na otimização dos parâmetros necessários à obtenção de separações adequadas.

12. STATISTICA

Statistica® (marca registrada em maiúsculas, como STATISTICA) é um software de métodos desenvolvido pela StatSoft . Statistica® fornece um pacote de ferramentas para a análise, gerenciamento e visualização de processos de dados e as suas técnicas incluem uma seleção de modelação preditiva, agrupamentos (clustering) e ferramentas exploratórias (Statsoft 2001).

A versão básica do software inclui funções como: Estatística Descritiva, análise exploratória de dados; correlações; Calculadora de Probabilidade; testes-t (e outros testes de diferenças de grupo); tabelas de frequência e análise de resposta múltipla.

13. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA)

Uma análise de variância visa fundamentalmente verificar se existe uma diferença significativa entre as médias e se os fatores exercem influência em alguma variável dependente. Dessa forma, permitem que vários grupos sejam comparados a um só tempo, esses fatores podem ser de origem qualitativa ou quantitativa, mas a variável dependente deverá necessariamente ser contínua. O teste é paramétrico (a variável de interesse deve ter distribuição normal) e os grupos têm que ser independentes. Por se tratar de um teste bastante difundido, inúmeros softwares estatísticos e planilhas eletrônicas possuem o procedimento para ser aplicado automaticamente.

14. REFERÊNCIAS

Altria, K. D.. Ed.. **Capillary Electrophoresis Guidebook. Principles, instrumentation, operation, and applications; Methods in Molecular Biology.** Series 52; Series Editor J. M. Walker; Humana Press, 1995.

AVELAR, Érica C.; FRANÇA, Adriana S.; FERRAZ, Vany P.. **Desenvolvimento e otimização de metodologia de cromatografia gasosa para identificação e quantificação de aminas bioativas em alimentos.** VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. UNICAMP, 2005 BRASIL.

BARROS, Cleide B. *et al.*. **Validação de métodos analíticos.** Apostila da REMESP, São Paulo, 2005.

BRITO, N. M.; AMARANTE JÚNIOR, O. P.; POLESE L; RIBEIRO M. L.. **Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão.** Pesticidas, v. 13, p. 129-146, 2003.

BUSTO, O. *et al.*. **Determination of biogenic amines in wine after clean-up by solid-phase extraction.** Chromatographia, v. 40, p. 404-410, 1995.

CURRIE, Lloyd A.. **Detection and quantification limits: origins and historical overview.** Analytica Chimica Acta, V. 391, p. 127-134, 1999.

GERVASIO, Ana P. G. *et al.*. **Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especificação.** Química. Nova, v. 26, p. 65-74, 2003.

GUIMARÃES, Judite L.. **Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e uréia como índices químicos de qualidade e frescor do pescado.** Tese de Doutorado, UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas: 2005 (PDF).

JOHNS, Kara F.; BREADMORE, Michael C.; BRUNO Raimondo; HADDAD Paul R.. **Evaluation of Peakmaster for computer aided multivariate optimisation of a CE separation of 17 antipsychotic drugs using minimal experimental data.** Electrophoresis v. 30, p. 839-847, 2009.

HRUSKA, V.; JAROS, M.; GAS, B.. **Simul 5 - free dynamic simulator of electrophoresis.** Electrophoresis v. 27, p. 984-991, 2006.

JORGENSEN, J. W.; LUKACS, K. D.. **Zone Electrophoresis in Open-tubular Glass Capillaries.** Analytical Chemistry, v, 53, p. 1298, 1981, apud QUEIROZ, S. C. do N. de; JARDIM, I. C. S. F. Em CHEMKEYS. Disponível em:

http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elecap_4/fluele_2/fluele_2.htm. Acesso em 02 de maio de 2010.

MICKE, G. A ; FUJIYA, Neide M.; TONIN, Fernando G.; COSTA, Ana C. O.; TAVARES, Marina F. M.. **Method development and validation for isoflavones in soy germ pharmaceutical capsules using micellar electrokinetic chromatography**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 41, p. 1625-1632, 2006.

SANTANA, A.K.M.; NUNES, L. C. C.; MEDEIROS, F. P. M.; SILVA, M. J.; LAVRA, Z. M. M. ROLIM NETO, P. J.. **Otimização e validação do método analítico volumétrico para quantificação do carbonato de cálcio**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. V. 28, p. 177-183, 2007.

SILVA, José A. F. da; COLTRO, Wendell K. T.; CARRILHO Emanuel; TAVARES, Marina F. M.. **Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares**. Química Nova, v. 30, p, 740-744, 1997.

SKOOG, D.; HOOLER, A.; NIEMAN, T. A.. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed.. Porto Alegre, Bookman, (Trad. Ignez Caracelli et al.) 2002.

St. CLAIRE, Robert L.; R. L.. **Fundamental Reviews**. Analytical Chemistry. V. 68, p. 569, 1996.

STATSOFT, Inc.. **Statistica for Windows** (Data Analysis Software System), version 6.0. 2001.

TAVARES, Marina F. M.. **Eletroforese capilar: conceitos básicos**. Química Nova, n. 2, v. 19, p.173-181, 1996.

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

VIM; **Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia**. 1995

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE CÁTIOS INORGÂNICOS MAJORITÁRIOS EM LEITE BOVINO E LEITE DE SOJA POR ELETROFORESE CAPILAR.

1. INTRODUÇÃO

O leite está entre os seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, sendo o sexto maior produtor de leite do mundo crescendo a uma taxa anual de 4%, superior à de todos os países que ocupam os primeiros lugares (Barbosa, 2002). A determinação de seu conteúdo nutricional torna-se importante para a indústria devido a necessidade diária desse alimento (SZE, 2007). O principal cátion encontrado no leite é o K^+ , com teor médio de $1,5 \text{ g L}^{-1}$, seguido por Ca^{2+} , com cerca de $1,2 \text{ g L}^{-1}$, Na^+ , com $0,5 \text{ g L}^{-1}$, e Mg^{2+} , com $0,12 \text{ g L}^{-1}$. Estes são muito importantes por determinarem a estabilidade físico-química do leite e também por apresentar grande relevância, especialmente no caso de Ca^{2+} , no crescimento e desenvolvimento de microorganismos (VEISSEYRE, 1988).

O consumo de cálcio é necessário para o desenvolvimento ósseo durante o crescimento e para a manutenção da integridade do esqueleto durante toda a vida adulta (CASÉ, 2005). Entre a população brasileira o consumo de cálcio está abaixo das recomendações, com dados que mostram que quase 100% desta ingerem inadequadamente cálcio, devido principalmente à falta de oferta de alimentos fontes deste mineral e o consumo reduzido dos mesmos. Além disso, para muitas pessoas o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) - "leite" de soja - pode substituir o leite bovino devido à sua intolerância, porém este se apresenta nutricionalmente suficiente apenas quando se refere à quantidade de proteína, pois quando se leva em consideração a quantidade dos micronutrientes como o cálcio, cujo conteúdo de aproximadamente 123mg por 100mL no leite bovino, o EHS não se torna um substituto adequado. Segundo o Instituto Nacional de Doenças Digestivas, Renais e Diabetes (EUA), cerca de 75% da população mundial é intolerante à lactose (HEANEY, 2005; SIMÕES, 2000). Por isso produtos como leite de soja passam a ser enriquecidos com cálcio, a fim de substituir o leite animal principalmente para os intolerantes à lactose, alérgicos e vegetarianos.

As determinações de potássio, cálcio, sódio e magnésio em produtos lácteos são frequentemente realizados por incineração do material orgânico, dissolvendo-se as cinzas em ácido concentrado, e, após diluição, a quantificação através do uso de espectroscopia de absorção atômica (AAS) (SIMÕES, 2000).

Apesar de a eletroforese capilar apresentar diversas vantagens na análise de alimentos (resolução, velocidade, simplicidade, automação, injeção de pequenos volumes de amostra, análises rápidas) e existirem na literatura vários métodos para a análise de cátions em outros tipos de matiz, poucas aplicações para a análise de íons metálicos no leite por detecção indireta foram encontrados. Uma das possíveis explicações para isto foi levantada por Kubán *et al.*, onde ele descreve os problemas encontrados devido a interferência causada pelo alto teor protéico encontrado no leite, o qual pode adsorver na parede interna do capilar e também interagir quimicamente com os agentes cromóforos contidos no eletrólito de corrida, necessários para a análise indireta. Kubán *et al.* utilizaram um eletrólito constituído por CTAB/PAP, pH 4,5, separando os íons cloreto, potássio, sódio, cálcio, magnésio, citrato e hidrogenofosfato em pouco mais de 4,5 minutos com detecção indireta em 262 nm. Já Suárez-Luque *et al.* usaram imidazol/ácido acético, pH 3,6, separando potássio, cálcio, sódio e magnésio em cerca de 4 minutos, com detecção indireta em 185 nm. Por sua vez, SZE *et al.* usaram imidazol/HIBA com 10% metanol, pH 6,0, para separar potássio, sódio, cálcio, magnésio, manganês, cádmio, cobalto, níquel e zinco em 6 minutos (KUBAN, 1998; SUÁREZ-LUQUE, 2007; SZE, 2007).

2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um método por eletroforese capilar (CE) para comparar, principalmente, as concentrações de cálcio, e também de potássio, sódio e magnésio entre leites de vaca e de soja. O eletrólito de corrida foi otimizado através de curvas de mobilidade efetiva, a fim de selecionar o co-íon e *software* Peakmaster[®] foi utilizado para selecionar as condições de funcionamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Instrumentação e condições do método

As análises foram conduzidas em equipamento de eletroforese capilar da marca Beckman Coulter, (P/ACETM MDQ), com detector de arranjos

de diodos. Foi utilizado capilar de sílica fundida recoberto com poliimida (Polymicro Technologies, EUA com 38,2 cm de comprimento total e 30,0 cm até o detector (50 μm I.D. x 375 μm O.D.), mantido a uma temperatura de 25°C durante as corridas. O eletrólito de corrida foi preparado diariamente e ao início dos trabalhos o capilar foi condicionado com hidróxido de sódio (1 molar) por 3 minutos, seguido de água desionizada por 3 minutos e depois pelo eletrólito de corrida por 5 minutos. Entre as corridas o capilar foi lavado durante 0,5 min com o eletrólito. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente sob pressão de 1 psi por 5 s. A tensão foi positiva de 15 kV com detecção em 214 nm.

3.2. Soluções

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico. O ácido 2-hidroxi isobutílico (HIBA) e imidazol foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Os padrões dos cátions sódio (NaNO_3), potássio (KIO_3), cálcio (CaCl_2), magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e bário ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram obtidos da Synth (São Paulo, São Paulo). Os sais dos padrões foram secos em estufa a 200°C por 2 h, deixados em dessecador à temperatura ambiente e acondicionados em frascos. Água deionizada (Milli-Q deionizador, Millipore, Bedford, MA, EUA) foi utilizado para preparar as soluções-padrão (200 mg L^{-1}) de sódio, potássio, cálcio e magnésio, e, separadamente, bário como padrão interno (P.I.) (100 mg L^{-1}). Todas as soluções estoque foram armazenadas sob refrigeração a 4°C. O Eletrólito de corrida foi composto por 15 mmol L^{-1} de imidazol e 30 mmol L^{-1} de HIBA, pH 3,9.

3.3. Amostras e processo de extração

Foram analisadas seis amostras, sendo estas de quatro diferentes marcas de leite bovino integral e duas diferentes marcas de leite de soja enriquecido com cálcio (segundo embalagem), obtidas no comércio local (Florianópolis/SC). Em um balão volumétrico de 100 ml adicionou-se 400 μL de cada amostra, completou-se o volume com água desionizada e posteriormente, acidificou-se as mesmas com ácido acético até um pH em torno de 4. Em seguida, estas foram centrifugadas por 10 minutos a 6.000 rpm e então coletados 900 μL do sobrenadante e neste adicionado 100 μL de padrão interno (bário) com concentração 100 mg L^{-1} e injetado no equipamento de eletroforese capilar.

3.4. Software

O *software* Peakmaster[®] 5.2 foi utilizado para a verificação dos valores de EMD, formação de picos de sistema, capacidade tamponante, e condutividade, os quais foram transferidos para o *software* Microsoft[®] Excel 2003 para construção dos gráficos. Também foi utilizado o *software* Statistica[®] 6, para os testes de análise de variância ANOVA e Tukey.

3.5. Figuras de mérito do método

3.5.1. Curva de calibração

Foram usadas soluções padrão dos analitos em cinco diferentes níveis de concentração de cátions ($2 - 10 \text{ mg L}^{-1}$), mantendo o padrão interno a uma concentração constante (10 mg L^{-1}). A preparação e injeção de cada nível de concentração foram realizados em duplicata, e as equações das curvas de calibração foram obtidas por meio do método dos mínimos quadrados.

3.5.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD e LQ foram calculados com base na avaliação de parâmetros de curva (razão entre desvio padrão do coeficiente linear da Equação e o coeficiente angular da curva analítica multiplicado por 3,3, no caso da LD, ou por 10, no caso da LQ.).

3.5.3. Precisão

A precisão intra-ensaio do método foi estabelecida através da análise de três amostras diferentes, na mesma concentração, analisadas todas em duplicata. Precisão intermediária (precisão inter-ensaio) foi estabelecida através da análise de três amostras, na mesma concentração, injetadas em duplicata, preparadas e analisadas no primeiro dia e de duas amostras, na mesma concentração, injetadas em duplicata, em outros 2 dias. Os resultados foram expressos como a porcentagem do desvio padrão relativo (DPR%).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento do método

Para a escolha das concentrações de cada componente do eletrólito de corrida, e conseqüentemente do pH de trabalho foi utilizado o *software* Peakmaster[®], com ele torna-se possível verificar os valores de EMD, formação de picos de sistema, capacidade tamponante e condutividade. Na Figura 4, construída a partir dos valores obtidos no *software*, é possível observar as curvas de mobilidade efetiva, condutividade, capacidade tamponante, e EMD, onde fixou-se uma concentração de 15 mmol L⁻¹ de imidazol e variando a concentração de HIBA entre 15 e 50 mmol L⁻¹

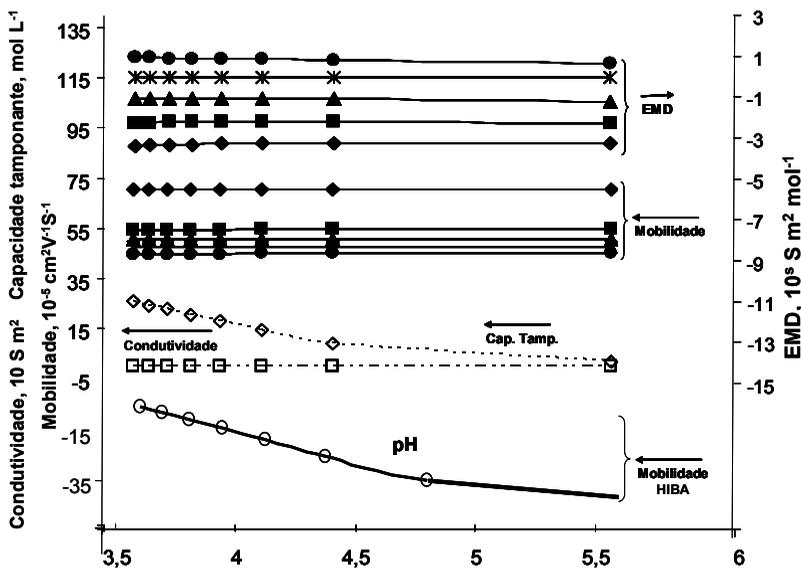


Figura 4. Curvas construídas utilizando o *software* Peakmaster[®]. Concentração constante de 15 mmol L⁻¹ de imidazol, com o HIBA variando de 15 a 50 mmol L⁻¹, gerando o pH mostrado na figura. Legenda para as curvas: (—◆—) potássio; (—■—) bário; (—▲—) cálcio; (—●—) magnésio; (—*—) sódio; (··◇··) capacidade tamponante; (··□··) condutividade.

Os analitos estudados permanecem em sua forma iônica em toda a faixa de pH de trabalho e estes possuem valores de mobilidade efetiva

suficientemente diferentes para serem separador por CE. Foi utilizado um padrão interno como forma de melhorar a precisão do método. Optou-se pela utilização do bário por este apresentar mobilidade efetiva próxima dos compostos analisados e não estar presente na amostra. Na escolha do co-íon (substância presente no eletrólito de corrida que apresenta mesma carga dos compostos analisados) optou-se pelo imidazol, pois, idealmente se procura um componente que apresente mobilidade mais próxima possível dos analitos, a fim de reduzir efeitos de dispersão por eletromigração (EMD), causando assimetria nos picos formados. Ele apresenta mobilidade efetiva de $47,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ S}^{-1}$, mobilidade bastante próxima do sódio (em torno de $47 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ S}^{-1}$), do magnésio (em torno de $45 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ S}^{-1}$) e do cálcio (em torno de $51 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ S}^{-1}$). O potássio, dentre os compostos estudados, é que apresenta mobilidade mais distante da do co-íon selecionado (em torno de $71 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ S}^{-1}$), porém, por apresentar a mobilidade mais alta, é o que permanece menos tempo dentro do capilar. Como a dispersão por difusão é dada por $2 \times D_i \times t$, sendo D_i o coeficiente de difusão e t o tempo, espera-se que o pico não apresente uma eficiência muito baixa. Como o imidazol não apresenta capacidade tamponante torna-se necessário a escolha de um componente no eletrólito que o possua, para ser utilizado como contra-íon (substância presente no eletrólito de corrida que apresenta carga contrária a dos compostos analisados). Optou-se pela utilização do HIBA (pKa 3,97), onde todos analitos e co-íon estão totalmente dissociados, trazendo robustez ao método (MICKE, 2006).

A partir dos resultados obtidos, optou-se pelo eletrólito constituído então de 15 mmol L^{-1} de imidazol e 30 mmol L^{-1} de HIBA, pH 3,93. Nesta concentração obtiveram-se diferenças de mobilidade efetiva suficientes para uma separação satisfatória de todos os compostos estudados. A escolha também levou em consideração a capacidade tamponante do eletrólito, preferivelmente alta. Os outros parâmetros estudados mantiveram-se praticamente constantes ao longo da faixa estudada.

Após a seleção do pH, os componentes do eletrólito e padrão interno, um eletroferograma foi simulado com o *software* Peakmaster[®]. Para isso, foi necessária a entrada das dimensões do capilar (comprimento total e até o detector), polaridade, tensão aplicada e o fluxo eletrosmótico (EOF). A Figura 5(a) mostra a simulação gerada no *software*, enquanto a Figura 5(b) mostra um eletroferograma real de uma mistura de padrões. Nelas é possível notar que há uma boa relação entre o eletroferogramas real e o simulado.

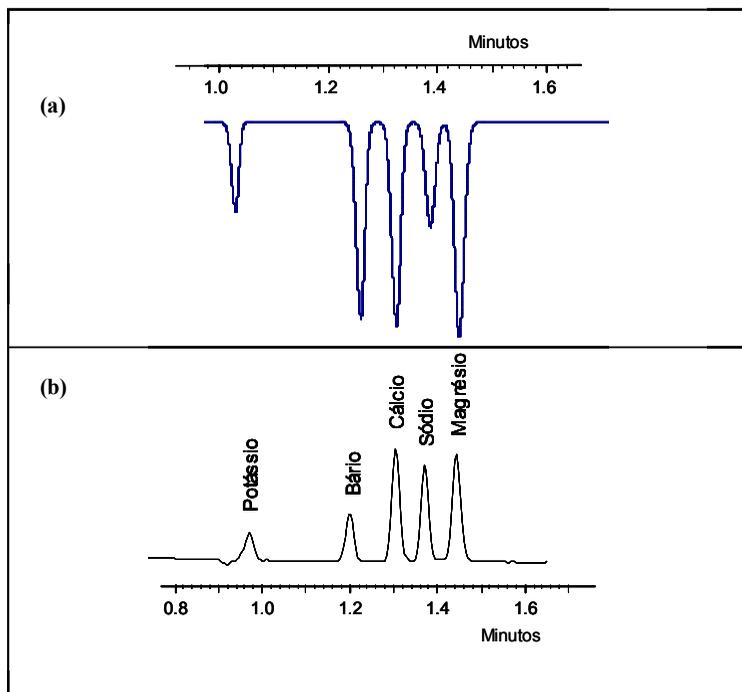


Figura 5. Eletroferogramas dos cátions estudados em (a) simulação utilizando o *software* Peakmaster® e (b) condições experimentais dos padrões em água. Eletrólito de corrida: 15 mmol L⁻¹ Imidazol, 30 mmol L⁻¹ HIBA, pH 3,93. Outras condições: comprimento efetivo de 28 cm, comprimento total de 38,2 cm, tensão 15 kV; injeção sob pressão de 1 psi por 5 segundos e detecção indireta no UV em 214 nm.

4.2. Figuras de mérito

4.2.1. Curva de calibração, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

As curvas de calibração construídas apresentaram coeficientes de determinação igual a 0,997; 0,988; 0,998 e 0,999 para potássio, cálcio, sódio e magnésio, respectivamente, o que significa linearidade considerada suficiente para a quantificação proposta. A faixa linear estudada variou de 2 a 10 mg kg⁻¹. Os limites de detecção e quantificação apresentaram valores de LD e LQ, respectivamente de 0,6 e 2,0 (potássio),

1,3 e 4,3 (cálcio), 0,5 e 1,8 (sódio) e 0,3 e 1,1 (magnésio). Todos os dados são apresentados na Tabela 3.

4.2.2. Precisão

Os valores de precisão intra-ensaio e intermediária variaram entre 2,57 % e 4,52 % e de precisão intermediária variaram entre 4,15 % e 6,16 %. Estes valores obtidos indicam a necessidade de repetição da construção da curva de calibração para todos os dias de análise.

Tabela 3. Figuras de mérito do método propostos.

Cátion	Área corrigida	Tempo de migração corrigido	Resolução	N
K ⁺	0,9461	1,2371	5,75 R _{K,Ba}	14000
Ca ²⁺	3,2064	1,0833	2,50 R _{Ba,Ca}	16900
Na ⁺	2,7832	1,0500	1,44 R _{Ca,Na}	11925
Mg ²⁺	3,3823	1,0549	1,67 R _{Na,Mg}	20736

Cátion	Equação Linear (ax + b)		CV % (médio)	R ²	LQ (mg kg ⁻¹) ^a	LD (mg kg ⁻¹) ^a
	a	b				
	K ⁺	0,1586				
Ca ²⁺	0,4423	0,2790	3,54	0,988	4,3	1,3
Na ⁺	0,4662	0,0774	4,43	0,998	1,8	0,5
Mg ²⁺	0,5822	-0,0997	3,46	0,999	1,0	0,3

Cátion	Precisão intra-ensaio ^b		Precisão intermediária ^c	
	Área corrigida média	(CV%)	Área corrigida média	(CV%)
K ⁺	0,6027	2,57	0,6098	4,15
Ca ²⁺	1,7972	2,94	1,8972	6,16
Na ⁺	1,8128	3,20	1,8706	5,41
Mg ²⁺	2,1660	4,52	2,2022	4,47

^a Concentração no capilar, ^b n = 6, ^c n = 7

4.2.3. Análise das amostras de leite

Após o método verificado este foi utilizado na análise das amostras de leite bovino e de leite de soja adquiridos no mercado local. Nas Figuras 6I e 6II estão os eletroferogramas obtidos respectivamente para a análise dos dois tipos de leite e neles pode-se notar que há uma boa resolução entre os picos obtidos, além de boa compatibilidade entre os mesmos e o obtido dos padrões em água (Figura 6III). Os resultados para a determinação dos cátions nas amostras estão disponíveis na Tabela 4. As amostras foram preparadas e analisadas em duplicata.

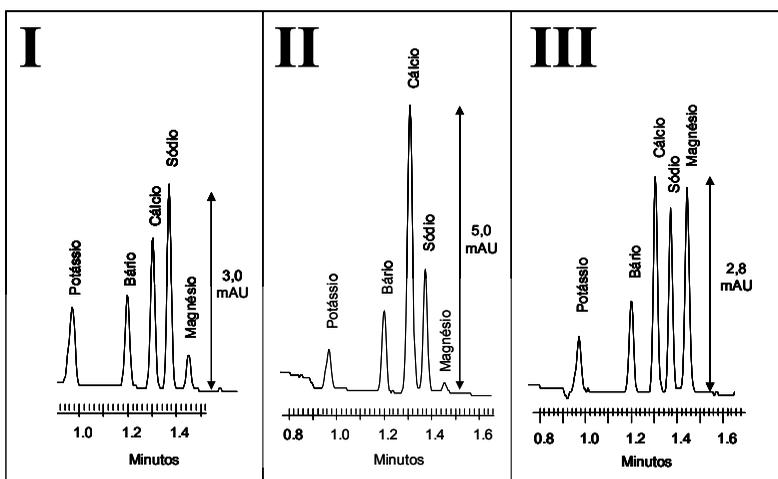


Figura 6. Eletroferogramas: I – amostra leite (vaca). II – amostra leite (soja). III – padrões 6 mg L^{-1} (P.I. 10 mg L^{-1}). Eletrólito de corrida: 15 mmol L^{-1} Imidazol, 30 mmol L^{-1} HIBA mmol L^{-1} . Outras condições: comprimento efetivo de 28 cm , comprimento total de $38,2 \text{ cm}$, tensão 15 kV ; injeção sob pressão de 1 psi por 5 segundos e detecção indireta no UV em 214 nm .

Tabela 4. Concentração dos cátions analisados nas seis amostras obtidas.

Amostras de Leite	Potássio (mg L⁻¹)	Cálcio (mg L⁻¹)	Sódio (mg L⁻¹)	Magnésio (mg L⁻¹)
Bovino A	1693 ±96 ^a	1307 ±46 ^{c,e}	762 ± 44 ^f	259 ±19 ^g
Bovino B	1826 ±138 ^a	1097 ± 41 ^d	1007 ±37 ^{g,h}	289 ±23 ^h
Bovino C	1618 ±58 ^a	1270 ±57 ^{c,e}	1023 ±57 ^g	262 ± 27 ^{g,h,i}
Bovino D	1623 ± 85 ^a	1146 ± 22 ^{c,d}	863 ± 42 ^{f,h}	272 ±20 ^h
Soja A	1233 ±42 ^b	1327 ±37 ^e	739 ±33 ^f	253 ±26 ^{g,i}
Soja B	1126 ±39 ^b	1422 ± 61 ^e	781 ±42 ^f	271 ±19 ⁱ

Dados de médias ± DP obtidos em duplicata. Resultados obtidos após teste A-NOVA: potássio [F=29,73; g.l.=5;6; p=0,000367]; cálcio [F=16,45; g.l.=5;6; p=0,00191]; sódio [F=19,92; g.l.=5;6; p=0,00113]; magnésio [F=33,80; g.l.=5;6; p=0,000254]. ^{a,b,c,d,e,f,g,h,i} Médias na mesma coluna com letras iguais não são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey (p <0,05).

Foi realizado o teste de análise de variância ANOVA para verificar se as médias das concentrações encontradas para cada cátions era significativamente diferente, a um nível de 95% de confiança, dentro do grupo de amostras. Como o resultado foi positivo, realizou-se em seguida o teste de Tukey, que compara os resultados em pares, identificando quais entre eles apresentam diferença significativa no nível de confiança escolhido. Ele foi feito para cada analito separadamente, assim como a ANOVA. Pelo teste pôde-se então estabelecer que, para o potássio, há uma diferença significativa na sua concentração entre as amostras de leite bovino e as amostras de leite de soja, sendo menor no segundo grupo. Para o cálcio não há um agrupamento dos resultados, isso acontece devido à concentração adicionada ao leite de soja ser variável, determinada pelos próprios fabricantes em busca de uma concentração semelhante à encontrada nos leites bovinos. Para sódio também houve grande variação encontrada entre cada marca, independente da origem, criando vários grupamentos diferentes no teste de Tukey. Isto já era esperado devido a concentração de sódio ser bastante variável mesmo nos rótulos das diversas marcas analisadas. No magnésio era esperado um comportamento semelhante ao encontrado na análise de potássio, devido a uma concentração maior de magnésio no leite de soja em relação ao encontrado no leite bovino, o que também resultaria em dois grupamentos bem distintos. No entanto, os grupamentos formados não comprovaram o esperado, o que pode ter acontecido devido à baixa concentração do cátion,

próximo ao limite de quantificação do método, que pode ocasionar a maiores erros nos valores determinados.

5. CONCLUSÃO

O método desenvolvido mostrou – se simples, rápido e eficiente para a determinação de cátions inorgânicos nos tipos de leite. É necessário um simples pré-tratamento, com acidificação e centrifugação da amostra. Os valores encontrados foram bastante similares para os diferentes tipos de leite, comprovando a possibilidade de substituição do mesmo de origem animal (vaca) pelo de origem vegetal (soja) sem perda nutricional referente aos íons analisados. O método desenvolvido baseado em eletroforese capilar, com detecção indireta por UV-vis pode ser usado como alternativo aos métodos baseados em espectroscopia de absorção atômica (AAS), com vantagens de custo e tempo, além de mais adequado ambientalmente, podendo ser empregado em análises de rotina.

6. REFERÊNCIAS

BARBOSA, Pedro F.. Engenheiro Agrônomo (Ed.). **Gado de leite: Importância econômica.** Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteSudeste/importancia.html>>. Acesso em: 05 set.

CASÉ, Fabiana *et al.* **Produção de 'leite' de soja enriquecido com cálcio.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 25, n. 1, p.86-91, mar. 2005.

HEANEY, R.P.; DOWELL, M.S.; RAFERTY, K.; BIERMAN, J.. **Bioavailability of the calcium in fortified soy imitation milk, with some observations on method.** The American Journal of Clinical Nutrition, n. 71, p.1166–1169, 2000.

HIROKAWA, Takeshi; NISHINO, Makoto; AOKI, Nobuyuki. **Table of isotachophoretic indices : I. Simulated qualitative and quantitative indices of 287 anionic substances in the range ph 3–10.** Journal Of Chromatography A, v. 271, n. 2, p.1-106, 1983.

KUBAN, P.; KARLBERG B.. **Simultaneous Determination of Small Cations and Anions by Capillary Electrophoresis.** Analytical Chemistry, n. 70, p. 360-365, 1998.

KUBÁN, P.; OLDHOFF, O.; KARLBERG, B.. **Flow injection analysis–capillary electrophoresis system with hydrodynamic injection.** Analytica Chimica Acta, v. 378, n. 1-3, p.55-62, janeiro 1999.

MICKE, G. A ; FUJIYA, Neide M.; TONIN, Fernando G.; COSTA, Ana C. O.; TAVARES, Marina F. M.. **Method development and validation for isoflavones in soy germ pharmaceutical capsules using micellar electrokinetic chromatography.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 41, p. 1625-1632, 2006.

MURTHY, G. K.; RHEA, U. **Determination of Major Cations in Milk by Atomic Absorption Spectrophotometry.** Journal of Dairy Science, n. 50, p. 313-317, 1967.

SUÁREZ-LUQUE, Silvia; MATO, Inês; . HUIDOBRO José F.. **Determination of major metal cations in milk by capillary zone electrophoresis.** International Dairy Journal, v. 17, p.896-901, 2007.

SIMÕES, P. A. H.. **A importância do diagnóstico da intolerância à lactose na prática pediátrica.** Nutrição em Pauta. São Paulo; Set/Out 2000. [acessado 2010 Nov 28]. Disponível em: URL: <http://www.nutricaoempauta.com.br>.

SZE, Kwan-Lok; YEUNG, William S.; FUNG, Ying-Sing. **Separation and determination of metal cations in milk and dairy products by CE.** *Electrophoresis* 2007, 28, 4156–4163

VEISSEYRE, R.. *Técnica Lactología*, Acribia, SA, Zaragoza, España (1988).

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO E NITRATO EM ALFACE

1. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca saliva L.*) é a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil, sendo a mais cultivada e adaptada ao sistema hidropônico, onde se destaca seu ciclo curto, o que possibilita um retorno mais rápido do capital investido (LUZ, 2008). Seu consumo é feito “*in natura*” e nessas condições apresenta a seguinte composição média em 100 g: 94% de água, 18 Kcal de valor calórico, 1,3 g de proteína, 0,3 g de gordura, 3,5 g de carboidratos totais, 0,7 g de fibra, 68 mg de cálcio, 27 mg de fósforo, 1,4 mg de ferro, 264 mg de potássio, 1900 UI de vitamina A, 0,05 mg de tiamina, 0,08 mg de riboflavina, 0,4 mg de niacina e 18 mg de vitamina C (POMMERENING, 1992). Segundo Santos, a produção hidropônica desta hortaliça no Brasil vem ganhando cada vez mais espaço devido à melhor utilização da área, precocidade na colheita, utilização mais eficiente de nutrientes, melhor qualidade do produto, possibilitando ainda o controle de fatores ambientais, que tornam limitantes seu cultivo em determinadas épocas do ano (SANTOS, 2008).

Nas plantas, o nitrogênio é dirigido preferencialmente para as partes fotossinteticamente mais ativas e por isso as hortaliças folhosas são aquelas que apresentam maior risco de acúmulo de nitrato (KROHN, 2003). A concentração de nitrato é um importante índice da qualidade dos alimentos, pois a exposição contínua ao mesmo é preocupante sob o ponto de vista toxicológico, devido à possibilidade de formação de compostos N-nitrosos (nitrosaminas), indutores de câncer (DUARTE, 1996). Quando ingerido pelo homem, o nitrato sofre ação microbiana na saliva e é reduzido a nitrito, o qual reage com aminas, dando origem a estes compostos carcinogênicos (MANTOVANI, 2005). Já no trato digestório, o nitrito pode fazer com que o oxigênio carregado de íon ferroso na molécula de hemoglobina seja oxidado para o estado férrico, convertendo-a em metahemoglobina, uma forma estável e inativa, que não transporta oxigênio e pode levar à morte (SWANN, 1985; WOLFF, 1982). Esta doença é chamada metahemoglobinemia ou doença do sangue azul (MATIAS, 2000).

Na literatura, diversos métodos para a determinação de nitrito e/ou nitrato em vegetais são descritos, incluindo colorimetria, potenciometria, métodos espectrométricos, biosensores, cromatografia de íons e eletroforese capilar de zona, entre outros (BADEA, 2001; BORIES, 1999; CASTELLANI, 1982; COLOMBARA, 1997; HAMILTON, 1976; JAGER, 2001; LEE, 2007; LYONS, 1991; MICHALSKI, 2006; NAM, 2008).

Distintas formas usando métodos eletroforéticos são descritos na literatura para a determinação simultânea de nitrito e nitrato, além de outros íons. Jimidar *et al.* propuseram um método baseado em eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção indireta para analisar 18 ânions simultaneamente (JIMIDAR, 1995). Esta análise dura cerca de 6,5 minutos e pode ser aplicada em diversos tipos de vegetais. Marshall *et al.* determinaram nitrito e nitrato em diferentes tipos de matrizes de alimentos, incluindo couve, queijo, suco de frutas, água e mais uma variedade de tipos de carne (MARSHALL, 1995). Suas análises duram pouco mais de 4 minutos para a determinação dos dois compostos e utiliza tiocianato como padrão interno. A eletroforese capilar oferece diversas vantagens na análise de alimentos como baixo consumo de reagentes e quantidade de amostra, mínima geração de resíduos, completa automatização, alta eficiência e poder de resolução, além de curtos tempos de análises quando comparadas a outras técnicas analíticas. Diversos métodos de separação para nitrito e nitrato são descritos por eletroforese capilar de zona em pH 3,5, pH 4,8, pH 7,4, pH 8 e pH 11,5 (BORIES, 1999; COLOMBARA, 1997; DAVIES, 1999; GAO, 2004; HAMILTON, 1976; JIMIDAR, 1995; MORCOS, 2001). Curiosamente, a alta resolução obtida experimentalmente nos estudos acima mencionados em pH básico não está de acordo com o que é esperado do banco de dados de mobilidade iônica, que relata uma diferença entre o nitrito e o nitrato de mobilidade apenas $0,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (MARSHALL, 1995).

2. OBJETIVO

O objetivo deste capítulo foi desenvolver um método para determinação de nitrito e nitrato em vegetais utilizando *softwares* de simulação de parâmetros de eletrólito de corrida e separação eletroforética para otimização sistemática do método.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos

As análises foram conduzidas em um equipamento de eletroforese capilar da marca Beckman Coulter, (P/ACE™ MDQ), equipado com detector de arranjos de diodos e detecção em 210 nanômetros. Foi utilizado um capilar de sílica fundida recoberto com poliimida (Polymicro Technologies, EUA com 30,2 cm de comprimento total e 10,2 cm até o detector (50 µm I.D. x 375 µm O.D.), mantido a uma temperatura de 25°C durante as corridas. O sonificador utilizado foi da marca Unique 1400A ultrasonic bath (Unique, São Paulo, Brasil) e como moinho de bancada um processador de alimentos Ika A49 (Brasil). O eletrólito de corrida foi preparado diariamente e ao início dos trabalhos o capilar foi condicionado com hidróxido de sódio (molar) por 3 minutos, seguido de água desionizada por 3 minutos e pelo eletrólito de corrida por 5 minutos. As amostras foram injetadas sob pressão de 0,8 psi por 8 s. A tensão aplicada foi de -30 kV (polaridade negativa no lado da injeção).

3.2. Reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau analítico. Tris-metilaminometano (TRIS) obtido da Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), a água utilizada em todos os procedimentos foi destilada e deionizada (deionizador Mili-Q, Milipore, Bedford, MA, EUA). O eletrólito de corrida foi composto por 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 10 mmol L⁻¹ de ácido clorídrico, pH 8,60. Ele era preparado diariamente a partir de soluções estoque de 100 mmol L⁻¹ dos dois padrões.

3.3. Software

Para a construção das curvas de mobilidade efetiva em função do pH, foi utilizado o *software* Microsoft® Excel 2003 e para as simulações de separação foi utilizado o *software* Peakmaster® 5.2 .

3.4. Amostras

Foram analisadas amostras de alface da qualidade mimosa, fornecidas pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis/SC). Estas plantas foram germinadas e cultivadas durante 16 dias em solução nutritiva definida como berçário, segui-

das de transplante para sistema hidropônico, mantidas em 4 formulações distintas de solução nutritiva (T1, T2, T3, T4). Foram iniciadas coletas de amostras folhear priorizando retirada de folhas do terceiro nível em intervalos de 120h, pós transplante da fase berçário, entre os dias 04 de novembro e 24 de dezembro de 2009. As coletas foram realizadas entre 8 e 9 horas da manhã, sendo a primeira coleta realizada no vigésimo sexto dia (26) pós semeadura, e a última no quadragésimo sexto dia (46). O sistema de coleta foi realizado de forma controlada de maneira a preservar as plantas, retirando folhas da terceira camada foliar, possibilitando acompanhar os mesmos indivíduos (plantas), durante todo o ciclo de cultivo.

3.5. Preparo das amostras

As folhas foram secas em estufa durante 12h a 50 (± 3) °C e trituradas em moinho de bancada (IKA – A11) até resultar em pó fino. Massas de 100 mg da amostra triturada foram extraídas com 10 mL de água ultra pura em sonicador durante 10min. Os extratos obtidos foram diluídos quatro vezes com água ultra pura contendo o padrão interno iodeto de potássio (KI) na concentração de 20 mg L⁻¹ para posterior análise.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Verificação da mobilidade iônica

Para a utilização tanto da planilha em *Excel* quanto do *software* de simulação Peakmaster[®] são necessárias algumas constantes: os valores de pKa para as substâncias analisadas e suas respectivas mobilidades iônicas. Como descrito anteriormente, os valores encontrados na literatura para a mobilidade do nitrito e do nitrato seriam insuficientes para a separação encontrada experimentalmente. Dessa forma utilizaram-se cálculos diferentes para a confirmação destes valores. Os valores utilizados como base no estudo se encontram na Tabela 5. Os dados de mobilidade iônica para os ácidos nítrico (pKa 1,37) e nitroso (pKa 3,22) foram verificados através da corrida eletroforética de uma amostra, realizada em triplicata, contendo uma mistura dos dois, além de brometo, iodeto, tiocianato, permanganato, bromato e iodato, em um eletrólito Tris/HCl, pH 8,12, com força iônica de 10 m mol L⁻¹. Utilizou-se então o tempo de migração médio para cada composto, sendo que o CV% foi inferior a 0,02%.

Tabela 5. Valores de mobilidade (literatura), tempos de migração (feitos em triplicata), tempos de migração médios, desvio padrão, variação percentual e inverso do tempo de migração médio para todos os compostos analisados.

ânions	Mobilidade ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	t1 (min)	t2 (min)	t3 (min)
brometo	-8,10E-08	2,204	2,208	2,212
iodeto	-7,96E-08	2,263	2,263	2,267
nitrito	-7,46E-08	2,454	2,454	2,462
nitrato	-7,41E-08	2,529	2,533	2,538
tiocianato	-6,85E-08	2,904	2,913	2,925
permanganato	-6,34E-08	3,321	3,296	3,325
bromato	-5,78E-08	3,987	4,004	4,021
iodato	-4,20E-08	9,846	9,929	10,017

ânions	média (segundos)	DP	CV%	1/t
brometo	132,480	0,004	0,003	7,548E-03
iodeto	135,860	0,002	0,002	7,361E-03
nitrito	147,400	0,005	0,003	6,784E-03
nitrato	152,000	0,005	0,003	6,579E-03
tiocianato	174,840	0,011	0,006	5,720E-03
permanganato	198,840	0,016	0,008	5,029E-03
bromato	240,240	0,017	0,007	4,163E-03
iodato	595,840	0,086	0,014	1,678E-03

A equação (4) relaciona a mobilidade efetiva μ_{eff} com o comprimento do capilar L , o comprimento até a janela de detecção l , a voltagem empregada na corrida V , além dos tempos de migração do analito t_m e do fluxo t_0 .

$$\mu = \frac{LxI}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right) \quad (4)$$

Segundo Johns *et al.*, pode-se relacionar a mobilidade eletroforética μ_{ep} e a mobilidade efetiva de acordo com a Equação (5), onde Z é igual a carga do composto, $Z_{no\ pH\ do\ BGE}$ é igual a carga do composto no pH do eletrólito de corrida, μ_{ep} é igual a mobilidade eletroforética e μ_{eff} é igual a mobilidade efetiva.

$$\mu_{ep} = \mu_{eff} - \left(\frac{Z}{Z_{no\ pH\ do\ BGE}} \right) \quad (5)$$

A partir do momento em que se garante a total ionização dos compostos envolvidos, o conhecimento do pH do BGE torna-se desnecessário, fazendo com que a mobilidade eletroforética e a efetiva sejam iguais. Assim pode-se determinar a mobilidade absoluta μ_{abs} como segue na Equação (6).

$$\mu_{abs} = \frac{\left(\mu_{ep} + \left(Z \cdot B_2 \cdot \left(\frac{\sqrt{IS}}{1 + 1,5\sqrt{IS}} \right) \right) \right)}{\left(1 - B_1 \cdot \left(\frac{q}{1 + \sqrt{q}} \right) \cdot \left(\frac{\sqrt{IS}}{1 + 1,5\sqrt{IS}} \right) \right)} \quad (6)$$

Onde B_1 é igual a $7,8171 \times 10^{-8} \text{ (mol m}^{-3}\text{)}^{-1/2}$, B_2 é igual a $3,138 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1} \text{ (mol m}^{-3}\text{)}^{-1/2}$, q é igual a 0.5 e IS é igual a força iônica. Aplicando a Equação (4) na Equação (6) e rearranjando-a chega-se a Equação (7).

$$\frac{1}{t_m} = \left(1 - B_1 \cdot \left(\frac{q}{1 + \sqrt{q}} \right) \cdot \left(\frac{\sqrt{IS}}{1 + 1,5\sqrt{IS}} \right) \right) \cdot \frac{V}{Ll} \cdot \mu_{abs} - \left(Z \cdot B_2 \cdot \left(\frac{\sqrt{IS}}{1 + 1,5\sqrt{IS}} \right) \right) \cdot \frac{V}{Ll} + \frac{1}{t_0 t_m} \quad (7)$$

Pode-se notar que a equação (4) tem a forma de uma equação da reta do tipo $y = a \cdot x + b$, onde y é igual ao inverso do tempo de migração dos

compostos e x a sua mobilidade absoluta. Assim é possível verificar a mobilidade absoluta para qualquer composto na mistura a partir do coeficiente angular da reta formada pelos tempos dos compostos restantes na mistura. Utilizaram-se então os dados descritos na Tabela 5 para construir uma reta (Figura 7). Como o nitrito apresentou-se nesta curva com comportamento não linear, quando comparado ao restante, ele não foi utilizado para a determinação dos valores da equação da reta. Utilizando então o coeficiente angular obtido, recalculou-se a mobilidade iônica para o nitrito, obtendo-se um valor condizente com os encontrados experimentalmente e também com as diversas separações obtidas em metodologias anteriores.

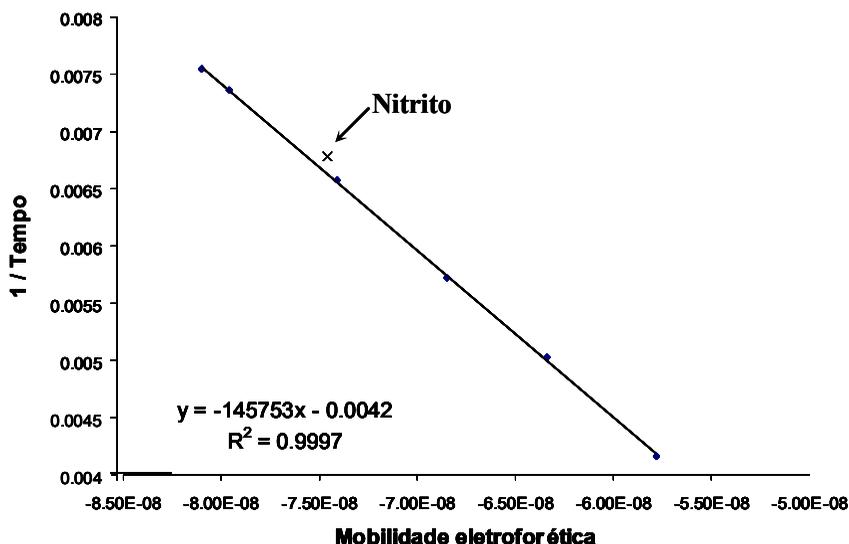


Figura 7. Curva de mobilidade eletroforética versus o inverso do tempo de migração dos analitos estudados, com o nitrito destacado fora da reta.

4.2. Escolha dos constituintes do eletrólito de corrida

Usando os valores de μ_0 e de pK_a compilados por Hirokawa *et al.*, foi construída a curva de mobilidade efetiva *versus* pH como mostrado na Figura 8 (HIROKAWA, 1983). Cloreto (Cl^-) foi escolhido como o co-íon do eletrólito de corrida, uma vez que tem mobilidade iônica muito semelhante aos analitos, contribuindo para minimizar a dispersão por eletromigração (GONÇALVES FILHO, 2007). No entanto, o cloreto não apresenta capacidade tamponante, tornando necessária a escolha de um contra-íon que o possua capacidade tamponante na faixa de pH escolhida. A separação entre o nitrito e o nitrato pode ser obtido em qualquer pH entre 5 e 14. É interessante usar um pH superior a 7, porque todos os solutos estão totalmente dissociados, tornando o método mais robusto, uma vez que a resolução não será afetada por pequenas variações. Portanto, TRIS foi selecionado como contra-íon, por fornecer a capacidade tamponante necessária ao BGE e por esta razão o pH de separação foi selecionado em torno de 8. O TRIS possui ainda outras vantagens como ser um padrão primário, além de existir o sal comercial Tris HCl, uma variante comum com concentrações equivalentes do sal e do ácido para apresentar pH igual a seu pK_a , permitindo a preparação do tampão a partir da mistura dos dois sólidos. Finalmente, a Figura 8 também mostra um composto com potencial para ser utilizado como padrão interno. O iodeto foi escolhido devido à sua mobilidade iônica próxima à do co-íon, absorver no ultravioleta, não reagir com os analitos, ser um eletrólito forte, não estar presente na amostra e também por apresentar maior facilidade de separação dos dois compostos estudados. Devido a alta mobilidade dos compostos em estudo, pode-se utilizar o modo contraeletromótico, apesar de o fluxo apresentar uma alta mobilidade na faixa de pH escolhido pois esta combinação (análise no sentido contrário à um fluxo de alta mobilidade) permite a redução de possíveis agentes interferentes. Além disso, um rápido tempo de análise foi obtido através da injeção pelo lado mais próximo ao detector e aplicação de campo elétrico elevado (937.5 V cm^{-1}).

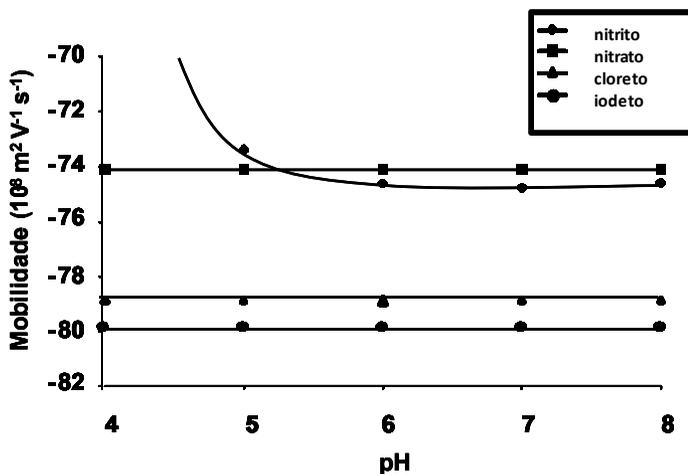


Figura 8. Variação da mobilidade eletroforética em função do pH para os ânions estudados, padrões internos possíveis e co-íon utilizado no eletrólito de corrida.

Depois de determinado o co e contra íon do BGE e o padrão interno, efetuou-se simulação da separação eletroforética no *software* Peakmaster[®], onde foi possível determinar as concentrações do eletrólito de corrida e condições do equipamento.

A Figura 9I mostra a simulação de um eletroferograma gerado no Peakmaster[®] utilizando os valores de mobilidade do próprio *software*, a Figura 9II mostra um eletroferograma gerado no Peakmaster[®] utilizando os valores de mobilidade recalculados pelo método proposto e 3III mostra um eletroferograma real de uma mistura de padrões.

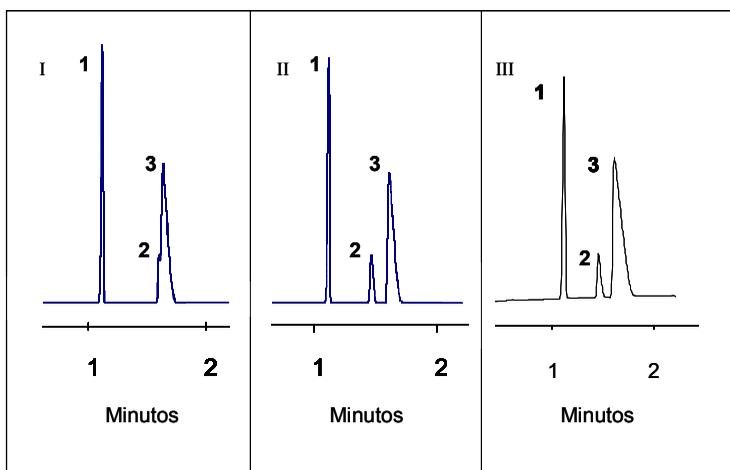


Figura 9. Eletroferogramas dos três compostos estudados em (I) simulação utilizando o *software* Peakmaster[®] com os valores de mobilidade disponíveis em sua biblioteca de dados, em (II) simulação utilizando o *software* Peakmaster[®] com os valores de mobilidade determinados através da curva construída e em (III) condições experimentais dos padrões em água. Para todos os eletroferogramas: 1 = iodeto (P.I.). 2 = nitrito. 3 = nitrato. Eletrólito de corrida: 40 mmol L⁻¹ TRIS e 10 mmol L⁻¹ de ácido clorídrico, pH 8,60. Outras condições (eletroferograma real): comprimento total do capilar de 30,2 cm, comprimento efetivo de 10,2 cm, tensão positiva de 30 kV, injeção sob pressão de 0,8 psi por 8 segundos e detecção em 210 nm.

Como se pode perceber na Figura 9I, a resolução entre os picos do nitrito e do nitrato é muito baixa, comprometendo totalmente a separação dos dois compostos. Já na Figura 9II, após a mudança na mobilidade do nitrito de $7,460 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para $7,565 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, determinada através da curva construída para sua verificação, houve não apenas uma melhora significativa na resolução, mas também uma proximidade maior com o eletroferograma da Figura 9III, obtido experimentalmente. Os resultados obtidos corroboram com a afirmação da necessidade de se verificar a mobilidade dos compostos estudados.

4.3. Figuras de mérito

4.3.1. Eletroferogramas

Antes de demonstrar a aplicabilidade do método proposto para a determinação de nitrito e nitrato em amostras de alfaces hidropônicas, a avaliação de alguns parâmetros, tais como linearidade, recuperação, repetibilidade, precisão, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram verificados. Em todos os casos 20 mg L⁻¹ do padrão interno foi usado e as razões de área de pico (nitrito ou nitrato / íon iodato) foram considerados. Os dados de desempenho analítico e algumas figuras de mérito do método proposto estão compilados na Tabela 6.

Tabela 6. Figuras de mérito do método propostos.

	Área corrigida	Tempo de migração corrigido	Resolução	N	
Nitrito	0,9461	1,30	4,91 R _{NO2,1}	59647	
Nitrato	3,2064	1,22	2,26 R _{NO3,NO2}	11099	
EQUAÇÃO LINEAR (AX + B)		CV % (médio)	R ²	LQ (mg kg ⁻¹) ^a	LD (mg kg ⁻¹) ^a
	a	b			
Nitrito	0,0277	-0,0027	1,79	0,9964	12,4
Nitrato	0,0308	0,1791	1,25	0,9997	24,2
Precisão intra-ensaio ^b			Precisão intermediária ^c		
	Área corrigida média	(CV%)	Área corrigida média	(CV%)	
Nitrito	0,842	1,97	0,845	1,81	
Nitrato	6,665	1,99	6,705	1,947	

4.3.2. Faixa linear

Sob as condições de análise otimizadas, a faixa linear do método entre 10 e 80 mg L⁻¹ para o nitrito e entre 70 e 560 mg L⁻¹ para o nitrato. Foi utilizada para o nitrato uma faixa bastante extensa (limite superior cerca de 8 vezes o limite inferior) na tentativa de conter a grande variabilidade das amostras, sem a necessidade de diferentes diluições. A injeção foi feita em quadruplicata autêntica para cada nível de concentração. Os coeficientes de regressão obtidos foram aceitáveis, melhor do que 0,9964 e 0,9997 para o nitrito e nitrato, respectivamente. A faixa linear foi considerada satisfatória para quantificar amostras reais.

4.3.3. Limite de detecção (LQ) e limite de quantificação (LD)

Os coeficientes de regressão linear obtidos através da curva de calibração foram considerados para estimar os valores de LD e LQ. Para nitrito e nitrato, os valores de LD de 3,7 e 7,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, e os valores de LQ de 12,4 e 24,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

4.3.4. Aplicabilidade

Para demonstrar a aplicabilidade do método desenvolvido por eletroforese, várias amostras de alface hidropônica da variedade mimosa, cultivadas em quatro formulações distintas de solução nutritiva, foram analisadas. Figura 10I mostra o perfil eletroforético da análise da amostra de alface. As amostras foram preparadas em triplicata autêntica e injetadas em duplicata. Concentrações de nitrato nas amostras são compilados na Tabela 7. As concentrações de nitrito estiveram abaixo do limite de detecção para todas as amostras analisadas.

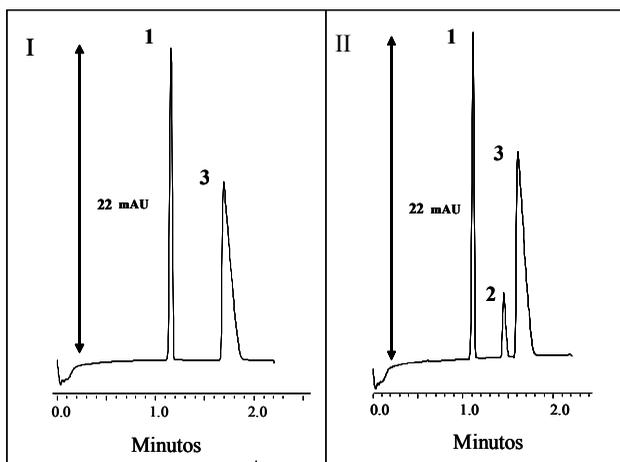


Figura 10. Eletroferogramas: I – amostra. II – padrões. 1 = iodeto (P.I). 2 = nitrito. 3 = nitrato. Eletrólito de corrida: 40 mmol L^{-1} Tris-metilaminometano e 10 mmol L^{-1} HCl; comprimento total do capilar de 30,2 cm, comprimento efetivo de 10,2 cm, tensão de 30 kV, injeção sob pressão de 0,8 psi por 8 segundos e detecção em 210 nm.

4.3.5. Resultados das amostras

Após o método testado, utilizou-se o mesmo para a análise de amostras fornecidas pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis/SC). Estas plantas foram germinadas e cultivadas durante 16 dias em solução nutritiva definida como berçário, seguidas de transplante para sistema hidropônico, mantidas em 4 tipos diferentes de solução nutritiva e foi feito então um monitoramento do crescimento das mesmas quanto à concentração de nitrato. Os resultados obtidos se encontram na Tabela 7. Os resultados podem ser usados, junto da avaliação de outros parâmetros como tamanho e massa foliar, para determinar qual a melhor solução nutritiva a ser empregada e também o tempo ideal de coleta da planta. Para isso foi feito um teste de variância ANOVA, para determinar se há diferença significativa, a um nível de 95% de confiança e, após resultado positivo, um teste de Tukey, que avalia dentro do grupo de resultados, quais são diferentes, para o mesmo nível de confiança do teste anterior.

Tabela 7. Resultados obtidos para as amostras em ppm de nitrato em massa fresca das amostras de alfaces analisadas, para as diferentes constituições de solução nutritiva.

Parâmetro	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 20	
T1	731.18 ± 14.53 ^{A,c}	995.26 ± 44.27 ^{B,b}	721.45 ± 32.32 ^{B,c}	1512.91 ± 49.89 ^{A,a}	
ppm nitrato	T2	605.81 ± 29.34 ^{B,c}	1342.28 ± 66.98 ^{A,a}	760.40 ± 28.14 ^{B,b}	1278.36 ± 58.37 ^{B,a}
(massa fresca	T3	695.69 ± 22.44 ^{A,c}	1066.84 ± 49.20 ^{B,b}	1146.89 ± 53.68 ^{A,b}	1342.93 ± 30.15 ^{B,a}
	T4	589.99 ± 15.23 ^{B,c}	783.46 ± 38.58 ^{C,b}	439.30 ± 18.19 ^{C,d}	1217.82 ± 48.44 ^{B,a}

Dados de médias ± SD obtidos em triplicata. ^{a,b,c,d} Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{A, B, C} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na tabela pode-se perceber que as amostras cultivadas com a solução nutritiva T4 apresentaram as menores concentrações de nitrato nos quatro períodos de coleta, sendo este o melhor tipo de tratamento quando se

considera apenas esta variável. Ainda se nota que, com este tratamento, o dia 15 foi o que apresentou melhores resultados.

Outra forma de observar os resultados foi construir curvas para descrever as concentrações encontradas em cada fase da planta, para cada tipo de solução nutritiva, elas foram feitas a partir dos dados da tabela 7 e se encontram na Figura 11. Pode-se observar que todas as plantas apresentaram um comportamento semelhante, com exceção talvez da alface submetida à solução nutritiva 3, demonstrando dois períodos de maior acúmulo de nitrato, que se possível deveriam ser evitados.

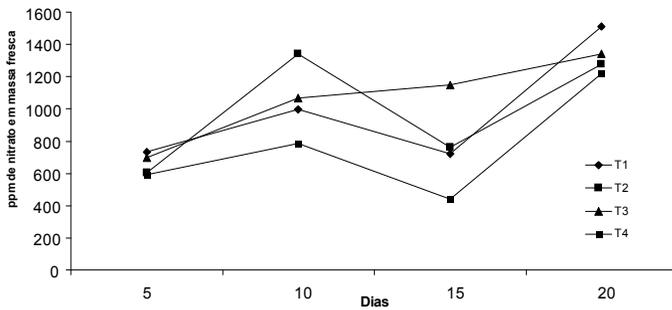


Figura 11. Quantidade de nitrato, em massa fresca, encontrado nas amostras com a variação de tempo de coleta.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo um método simples, rápido e confiável para a determinação de nitrito e nitrato pode ser desenvolvido. Este se apresenta como alternativa em análises de rotina para atestar a qualidade de alfaces hidropônicos, por apresentar um desempenho analítico eficiente em um tempo de análise extremamente curto, de baixo custo e que envolve um tratamento de amostra bastante simplificado. Foi possível empregar um novo método para a verificação e determinação da mobilidade iônica dos compostos de maneira simples e rápida, sem a necessidade prévia de diversas variáveis (como campo elétrico, força iônica, tamanho do capilar e mobilidade do fluxo eletrosmótico), pois não entram na equação utilizada; o que o torna extremamente útil no desenvolvimento de métodos por eletroforese capilar.

6. REFERÊNCIAS

BADEA, Micaela; AMINE, Aziz; PALLESCHI, Giuseppe. New electrochemical sensors for detection of nitrites and nitrates. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, v. 509, p.66-72, 2001.

BORIES, P. N.; SCHERMAN, E.; DZIEDZIC, L.. **Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by capillary electrophoresis**. *Clinical Biochemistry*, v. 32, n. 1, p.9-14, 1999.

CASTELLANI, Franca; BARTOCCIA, V.; GUSTERIA, Maura; PUCCIARELLIAL, Filippo. **Potentiometric determination of nitrite with an ammonia gas sensor**. *Analytica Chimica Acta*, v. 138, p.381-383, 01 jun. 1982.

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

DAVIES, C. A.; PERRETT D; ZHANG Z; NIELSEN B. R; BLAKE D. R; WINYARD P. G.. **Simultaneous analysis of nitrite, nitrate and the nicotinamide nucleotides by capillary electrophoresis: application to biochemical studies and human extracellular fluids**. *Electrophoresis*, v. 20, p.2111-2118, 1999.

DUARTE, M.; MÍDIO, A. F.. **Nitratos e nitritos em alimentos**. *Cadernos de Nutrição*, v.12, p.19-30, 1996.

GAO, LEYI; BARBER-SINGH J.; KOTTEGODA S.; WIRTSHAFTER D; SHIPPY S. A... **Determination of nitrate and nitrite in rat brain perfusates by capillary electrophoresis**. *Electrophoresis*, v. 25, p.1264-1269, 2004.

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* , v. 1154, p. 477-480, 2007.

HAMILTON, J. E.. **Collaborative study of the colorimetric determination of nitrate and nitrite in cheese**. *Journal. Association of Official Analytical Chemists*, v. 59, n. 2, p. 284-288, mar. 1976.

HIROKAWA, Takeshi; NISHINO, Makoto; AOKI, Nobuyuki. Table of isotachophoretic indices : I. Simulated qualitative and quantitative indices of 287 anionic substances in the range ph 3–10. **Journal Of Chromatography A**, [s.i.], v. 271, n. 2, p.1-106, 1983.

JAGER, Alessandra V.; TAVARES, Marina F. M.. **Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações**. *Química Nova*, v. 24, n. 3, p.363-373, 2001.

JIMIDAR, M.; HARTMANN, C; COUSEMENT, N; MASSART, D. L.. **Determination of nitrate and nitrite in vegetables by capillary electrophoresis with indirect detection.** Journal Of Chromatography A, v. 706, p.479-492, 1995.

JOHNS, Kara F.; BREADMORE, Michael C.; BRUNO, Raimundo; HADDAD, Paul R. **Evaluation of Peakmaster for computer-aided multivariate optimization of a CE separation of 17 antipsychotic drugs using minimal experimental data.** Electrophoresis, v. 30, n. 5, p. 839-847, 2009.

KROHN, N. G.; MISSIO, R. F.; ORTOLAN, M. L.; BURIN, A.; STEINMACHER, D. A.; Lopes, M. C.. **Teores de nitrato em folhas de alface em função do horário de coleta e do tipo de folha amostrada.** Horticultura Brasileira, Brasília, v. 21, n. 2, p. 216-219, 2003.

LEE, Jong K; LEE, Seok J.; KIM, Moo H.; KIM, Hee; NA, Byung K.; HWANG, Tae S.; PARK, Do H.. **Total nitrogen (TN) analysis by combination of nitrate biosensor and electrochemical nitrification reactor.** Journal Of The Korean Society For Environmental Analysis, v. 10, p.21-28, 2007.

LUZ, G. L.; M., S. L. P.; MANFRON, P. A. Amaral, A.D.; MÜLLE, L.; MIKE, G. T.; MENTGES, Lenise. **A questão do nitrato em alface hidropônica e a saúde.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 38 n. 8, p. 2388-2394, 2008.

LYONS, David J.; MCCALLUM, Leith E.; OSBORNE, William J.. **Assessment of procedures for the determination of nitrate and nitrite in vegetable extracts.** Analyst, v. 116, n. 2, p.153-157, 1991.

MANTOVANI, J. R.; CRUZ, M. C. P. da; FERREIRA, M. E.; BARBOSA, J. C.. **Comparação de procedimentos de quantificação de nitrato em tecido vegetal.** Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v. 1, n. 40, p. 53-59, 2005.

MARSHALL, Philip A.; TRENERRY, V. Craige. **The determination of nitrite and nitrate in foods by capillary ion electrophoresis.** Food Chemistry, v. 57, n. 2, p.339-345, 1995.

MATIAS, G. C. S.; COMETTI, N. N. e FERNANDES, M. S. **Teor de nitrato nas várias partes da alface.** In: X JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA UFRRJ, 2000, Seropédica, 2000.

MICHALSKI, R.; KURZYCA, I.. **Determination of Nitrogen Species (Nitrate, Nitrite and Ammonia Ions) in Environmental Samples by Ion Chromatography.** Polish Journal Of Environmental Studies, v. 15, p.5-18, 2006.

MORCOS, E.; WIKLUND, N. P.. **Nitrite and nitrate measurement in human urine by capillary electrophoresis.** Electrophoresis, v. 22, p.2763-142768, 2001.

NAM, Pham H.; ALEJANDRA, Benitez; FREDERIC, Hommet ; DIDIER, Schoefs O.; PAUSS, André. **A new quantitative and low-cost determination method of nitrate in vegetables, based on deconvolution of UV spectra.** Talanta, v. 76, n. 4, p.936-940, 15 ago. 2008.

POMMERENING, B. *et al.*. **Indagine sul contenuto di nitrati negli ortaggi dell area metapontina.** Inf Agrár., Roma, v. 19, p 47-53, 1992.

SANTOS, Ademir O.; NETO, Benedito L. R.; ZWIRTES, Diane S.; SILVA, Rodolfo B. da.; YONENAGA, Willian H. **PRODUÇÃO DE ALFACE HIDROPÔNICA: UMA ABORDAGEM PELA DINÂMICA DE SISTEMAS.** In: Congresso Brasileiro de Sistemas, 4., 2008, Franca. Anais... . Franca: **Uni-facef**, p. 1-15, 2008.

SWANN, P. F.. **The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitrous compounds.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 26, p. 1761-1770, 1975.

WOLFF, I. A.; WASSERMAN, A. E.. **Nitrates, nitrites, and nitrosamines.** Science, v.177, p.15-19, 1972.

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PEIXES E CRUSTÁCEOS COMERCIALIZADOS EM FLORIANÓPOLIS

1. INTRODUÇÃO

Aminas Biogênicas (BA) são bases orgânicas de baixa massa molar sintetizadas durante o processo metabólico em todos os organismos vivos. Elas possuem estrutura alifática, aromática ou heterocíclica e têm como principal via de formação a descarboxilação microbiana de aminoácidos (AVELAR, 2005).

BA em baixas concentrações podem ser formadas em alimentos não fermentados como frutas, vegetais, carne, leite e peixe (ÔNAL, 2007). As BA representam um importante grupo de produtos naturais tóxicos e a maioria das intoxicações alimentares causadas por BA está relacionada com a histamina, que em doses elevadas pode causar dores de cabeça, náuseas, hipertensão e problemas digestivos (KVASNICKA, 2006).

Nos peixes, principalmente os pertencentes à família *Scombridae* e *Clupeidae*, os níveis de histidina livre em seus músculos são relativamente altos quando vivos, sendo que o processo de degradação *post-mortem* libera ainda uma quantidade de histidina adicional (ROSSANO, 2006). Esta característica explica o porquê de serem encontradas concentrações elevadas de histamina sem a formação de indicadores organolépticos de deterioração.

Considerando os potenciais efeitos nocivos da histamina ao sistema nervoso e imunológico, o desenvolvimento de métodos simples, rápidos e sensíveis para a sua análise torna-se necessário (ZHANG, 2004). A legislação brasileira determina que o conteúdo máximo de histamina em peixes não deve ser superior a 100 mg kg^{-1} , tomando como base a média de amostras analisadas, sendo que nenhuma unidade de amostra pode apresentar um valor superior a 200 mg kg^{-1} (BRASIL, 1998).

Os principais métodos explorados para determinação de histamina são a cromatografia gasosa (GC), cromatografia em camada delgada (CCD), eletroforese capilar de zona (CZE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo a última a que mais possui relatos de utilização para quantificação de aminas biogênicas. Por possuir alta eficiência de separação (tipicamente acima de 10^5 pratos teóricos), tempos de análise reduzidos, alto grau de automação e baixo custo por análise,

quando comparada com HPLC, as técnicas eletroforéticas vêm surgindo como uma ferramenta alternativa de alta relevância no meio analítico (AVELAR, 2005; BUSTO, 1995; GUIMARÃES, 2005).

Oguri *et al.* publicou artigos referentes à análise de histamina com tempo de separação de 10 minutos (OGURI, 1997). A análise foi feita em matriz complexa (mariscos) e envolveu técnicas de derivação dentro do capilar e detecção por fluorescência como forma de aumentar o sinal analítico. Já KOVÁCSA *et al.* estudou a separação de 7 diferentes aminas biogênicas com detecção UV em amostras de alimentos, utilizando eletroforese capilar no modo cromatografia electrocinética micelar (MEKC), porém a análise apresentou um tempo de separação elevado (30 minutos) (KOVÁCSA, 1999). Após o ano de 2000, diversos artigos foram publicados sobre análises de histamina e outras aminas biogênicas em diversos tipos de amostra, demonstrando a versatilidade da técnica em diferentes matrizes. Entretanto, como forma de aumentar o sinal analítico ou aumentar a eficiência das bandas, a grande maioria dos trabalhos utiliza a derivatização dentro ou fora do capilar, com detecção por fluorescência ou variações desta (DRIOUICH, 2001; LIU, 2003; MALE, 2001; ZHANG, 2005). Utilizando o modo de eletroforese capilar por zona, Cinquina *et al.* realizou uma comparação entre métodos validados para análise de histamina em atum utilizando HPLC e CE com limites de detecção de 1 mg Kg^{-1} em 5 minutos de corrida, porém há a utilização de ácido clorídrico para o preparo de amostra, e o tempo total de análise foi em torno de 25 minutos (CINQUINA, 2004).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é desenvolver um método analítico quantitativo para histamina em peixe (fresco e enlatado) e camarão por eletroforese capilar de zona, simplificando o máximo possível o pré-tratamento de amostra, visando facilidade operacional e diminuição de custo e tempo de análise.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Instrumentação

As análises foram realizadas inicialmente em um equipamento de eletroforese capilar, modelo HP^{3D} CE, Agilent Technologie, (Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com um detector com arranjo de diodos, e um equipamento de eletroforese capilar modelo P/ACETM MDQ (Beckman

Coulter), optando-se na sequência pela utilização do segundo. Foram utilizados capilares de sílica fundida recoberto com poliimida (Polymicro Technologies, E.U.A.) com 50,2 cm de comprimento total e 10,2 cm de comprimento até o detector (50 μm D.I.) A temperatura do capilar foi mantida em 25°C. O eletrólito de corrida foi preparado diariamente e ao início dos trabalhos o capilar foi condicionado com hidróxido de sódio (1 mol L⁻¹) por 3 minutos, seguido de água deionizada por 3 minutos e pelo eletrólito de corrida por 5 minutos. Entre as corridas o capilar foi lavado durante 0,8 min com o eletrólito. A injeção foi realizada hidrodinamicamente sob pressão de 0,8 psi por 8 s pela extremidade mais próxima a janela de detecção. A tensão aplicada foi de -20 kV e a detecção foi feita em 214 nm.

3.2. Soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água desionizada (desionizador Mili-Q, Milipore, Bedford, MA, E.U.A.). Dihidrogênio ortofosfato monossódico dihidratado (NaH₂PO₄.H₂O), hidrogênio ortofosfato dissódico dihidratado (Na₂HPO₄.H₂O), hidróxido de sódio (NaOH) e tetraborato de sódio (TBS) obtidos da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); tris-metilaminometano (TRIS), ácido 2-hidroxisobutírico (HIBA) e imidazol obtidos da Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), metanol, etanol absoluto e éter etílico obtidos da Tédia Brazil (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e histamina obtida da Acros organics (New Jersey, USA). O eletrólito de corrida foi composto por 60 mmol L⁻¹ de HIBA e 30 mmol L⁻¹ NaOH em água, com pH 3,8. Dele foi preparada uma solução estoque com um volume de 100 mL e armazenado sob refrigeração (4 °C) até o momento do uso. Sempre antes da utilização foram adicionados 0,25 mmol L⁻¹ de brometo de hexano-1,6-bis(trimetilamônio) (HEXA-Br) como complexante da parede interna do capilar.

Foi preparada solução estoque a partir da histamina padrão para concentração final de 600 mg L⁻¹. Esta então foi mantida sob refrigeração até o momento do uso, onde era então diluída até a concentração de interesse.

3.3. Determinação da mobilidade eletroforética da histamina

Para a construção das curvas de mobilidade efetiva *versus* pH é necessário conhecer os valores de pKa e mobilidade iônica μ_{0,A^-} . O valor

de pK_a para histamina está disponível na literatura, entretanto, o valor de mobilidade iônica não. Assim sendo foi realizado um procedimento para a determinação deste valor. O procedimento é descrito na seção 4.1.

3.4. Amostras e processo de extração

O atum foi adquirido no Mercado Público de Florianópolis/SC, onde é possível a obtenção de pescados com alto grau de frescor, e em redes de supermercado. As amostras de atum enlatado, pintado e camarão foram obtidas em redes de supermercado local. Elas foram então preparadas utilizando-se 10 gramas de massa homogêneos em 100 mL de etanol hidratado comercial (92,8%) em mixer (modelo R11350 220 V Walita). Em seguida, foram retiradas alíquotas de cerca de 2 mL e centrifugadas em microcentrífuga (modelo Minitube) a 6.000 rpm (2.000 x g) por 3 minutos. Na sequência, o extrato assim obtido foi diluído em etanol:solução PI (solução contendo o padrão interno):água (2:1:1, v/v/v). A solução do padrão interno foi constituída por 15 mg L⁻¹ de imidazol em água. A mistura então foi levada para a análise.

3.5. Software

Após determinada a mobilidade da histamina foi utilizado o *software* Microsoft® Excel 2003 para construção da curva de mobilidade do composto. O *software* Peakmaster® 5.2 também foi utilizado para a verificação dos valores de EMD, formação de picos de sistema, capacidade tamponante, eletrólito de corrida e condutividade. Testes de normalidade, ANOVA e Tukey foram feitos no *software* STATISTICA®

3.6. Figuras de mérito

3.6.1. Curva de calibração, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Foram usadas soluções padrão dos analitos em quatorze diferentes níveis de concentração (0,25 -15 mg L⁻¹), mantendo o padrão interno a uma concentração constante (15 mg L⁻¹). A preparação e injeção de cada nível de concentração foram realizadas em duplicata, e as curvas de calibração foram construídas por meio do método dos mínimos quadrados. O LD e LQ foram calculados com base na avaliação de parâmetros de curva (razão entre o desvio padrão do coeficiente linear da equação e

o coeficiente angular da curva analítica multiplicado por 3, no caso da LD, ou por 10, no caso da LQ.).

3.6.2. Precisão

Para todas as medidas de precisão foram utilizadas amostras preparadas a partir da diluição da solução estoque, preparada no início dos trabalhos. A precisão intra-ensaio do método foi estabelecida através da análise de quatro amostras, na mesma concentração, analisadas todas em duplicata, totalizando 8 corridas. A precisão instrumental foi estabelecida pela injeção de uma mesma amostra em quintuplicata e a precisão intermediária (precisão inter-ensaio) foi estabelecida através da análise de quatro amostras, na mesma concentração, injetadas em duplicata, preparadas e analisadas no primeiro dia e duas amostras, na mesma concentração, injetadas em duplicata, em outros 2 dias. Os resultados foram expressos como a porcentagem do desvio padrão relativo (RSD %).

3.6.3. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da porcentagem de recuperação medida pela adição de diferentes concentrações do padrão em uma das amostras de atum fresco. Essa amostra foi dividida em 10 partes e estas foram fortificadas com cinco soluções de padrão, feitas em pares, para serem analisadas em duplicata e com concentrações finais de 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 5,0 mg kg⁻¹. As amostras então passaram pelo tratamento de preparo e extração já descritos anteriormente e analisados. As áreas foram então determinadas e suas concentrações calculadas em relação à curva de calibração construída pelos padrões em água e então determinado o rendimento da extração. A exatidão foi calculada e expressa como porcentagem de recuperação.

3.6.4. Seletividade

A seletividade foi determinada como a razão entre as inclinações das curvas analíticas obtidas pelo método da adição de padrão e pelo método da calibração externa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da Mobilidade Iônica

A expressão que relaciona a mobilidade real μ_{act,A^-} com a mobilidade efetiva é apresentada na Equação 8. A mobilidade real é a mobilidade da espécie iônica totalmente dissociada numa dada temperatura e força iônica.

$$\mu_{eff,A^-} = \frac{\mu_{act,A^-}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (8)$$

Se o valor de $pH \gg pK_a$

$$\mu_{eff,A^-} \cong \mu_{act,A^-} \quad (9)$$

A partir da Equação 9 pode-se observar que em pH muito acima do valor de pK_a ($\cong 2$ unidades maior) o valor da mobilidade efetiva se aproxima do valor da mobilidade real.

A partir do valor da mobilidade real em valores baixos de força iônica pode-se obter o valor da mobilidade iônica numa dada temperatura a partir da Equação 10.

$$\mu_{act,A^-} = \mu_{0,A^-} \left[\frac{159,36}{\varepsilon_r^{3/2}} \mu_{0,A^-} + \frac{0,2476 \times 10^{-5}}{\eta \varepsilon_r^{1/2}} \right] \sqrt{I} \quad (10)$$

Onde μ_{0,A^-} é a mobilidade iônica de A^- . Em água, pela literatura, a $25^\circ C$ $\varepsilon_r = 78,54$; $\eta = 0,890 \times 10^{-3}$ Pa.s; I é a força iônica do eletrólito.

A determinação do valor da mobilidade efetiva num valor de $pH \gg pK_a$ para um eletrólito univalente de força iônica 10 mmol L^{-1} foi feita utilizando o procedimento desenvolvido por Williams e Vigh (WILLIAMS, 2006).

Os valores de mobilidade iônica e pK_a para a histamina foram 30,7 e $61 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 6,0 e 9,8 respectivamente (KVASNICKA, 2006).

A partir destes dados foi possível construir as curvas de mobilidade efetiva em função do pH, Figura 12.

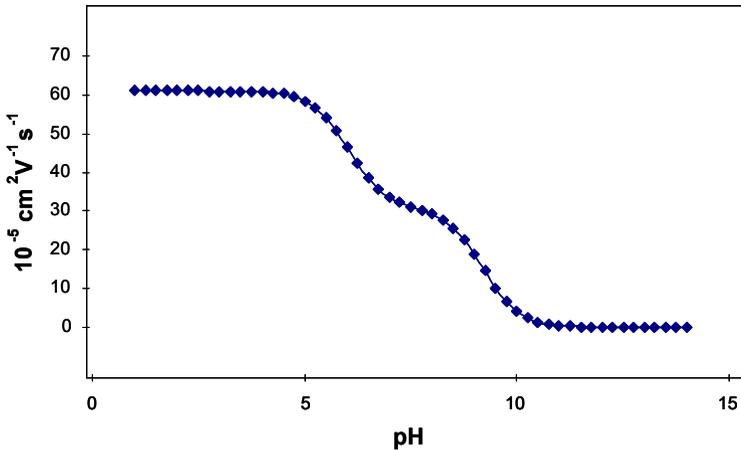


Figura 12. Curvas de mobilidade efetiva *versus* pH

4.2. Desenvolvimento do método

A partir da curva de mobilidade construída (Figura 12) pode-se estipular duas faixas onde se obtêm velocidade constante e diferente de zero para pequenas variações de pH, estas são escolhidas preferencialmente pois trazem maior robustez ao método e se encontram nos patamares da curva (região de pH abaixo de 5 e próximo a 7,5). Em pH mais baixo é possível obter maior eficiência de pico devido a maior velocidade do composto. Nesta faixa de pH a histamina apresenta-se com duas cargas positivas o que a princípio poderia promover a interação da mesma com a parede negativa do capilar. Entretanto nesses valores as paredes do capilar apresentam carga negativa reduzida em relação a valores mais altos devido à protonação dos grupos silanóis, o que reduz este tipo de interação.

A fim de reduzir o ruído da linha base e fenômenos de dispersão por eletromigração (EMD) baseou-se a escolha do co-íon em sua mobilidade eletroforética, que deve ser próxima à mobilidade do composto analisado [26]. O escolhido foi o íon sódio que apresenta mobilidade de $56 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, enquanto a mobilidade determinada da histamina é em torno de $61 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Como o sódio não apresenta capacidade tampicante, torna-se necessária a escolha de um contra-íon que possua na faixa de pH escolhida. O ácido 2-hidroxi isobutílico (HIBA) foi selecionado como contra-íon, por fornecer a capacidade tampicante necessária ao BGE e por esta razão o pH de separação foi selecionado em torno de

4. Ele possui ainda outras vantagens como ser um padrão primário, além de não absorver no comprimento de onda selecionado (214 nm).

Optou-se também pela introdução da amostra pelo lado mais próximo do detector, reduzindo assim o tempo de migração da histamina e consequentemente o tempo de análise.

4.3. Padrão interno (P.I.)

A precisão da injeção é provavelmente a parte mais crítica nas análises por eletroforese capilar [25]. Este fato pode estar associado a diferenças na maneira como amostra é injetada. Em HPLC a amostra é injetada por *loops* e pode ser facilmente controlada, já em CE utiliza-se normalmente de pressurização do frasco da amostra para forçar a sua transferência para o capilar.

Quando comparada a injeções de equipamentos comerciais de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), onde se obtêm precisões próximas a 1% de RSD, os equipamentos de eletroforese apresentam certa desvantagem por utilizar volumes na ordem de nanolitros e não microlitros, como em HPLC. Assim, o volume injetado está diretamente relacionado ao tempo e à pressão aplicada. Há ainda fatores sutis que afetam diretamente a quantidade de amostra injetada como sifonamento, viscosidade da amostra e tensão superficial. Todos esses fatores podem levar a variações significativas de volume injetado e consequentemente na área do pico obtido nos eletroferogramas, necessário o uso de um padrão interno (ALTRIA, 2002).

Um padrão interno deve gerar um pico simétrico e bem resolvido no eletroferograma e preferencialmente não aumentar o tempo de corrida. Para se conseguir isso, normalmente a escolha é definida mediante observação da curva de mobilidade para os possíveis padrões internos. Além disso, são preferíveis outras características como solubilidade na amostra, apresentar boa sensibilidade no comprimento de onda de detecção, não tóxico e estável, além de não fazer parte nem diluir os constituintes da amostra. De acordo com o exposto optou-se pela utilização do imidazol.

Devido à proximidade entre o padrão interno e o pico da histamina no eletroferograma foi testada a utilização do brometo de hexano-1,6-bis(trimetilamônio) (HEXA-Br), um complexante da parede interna do capilar, que tem por finalidade reduzir o fluxo eletrosmótico resultando em aumento da resolução entre os dois picos. Foram testadas várias concentrações diferentes do complexante para que a quantidade utilizada fosse apenas a necessária para a separação. Após os testes, optou-se pela

adição de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ do complexante, gerando o eletroferograma da Figura 13.

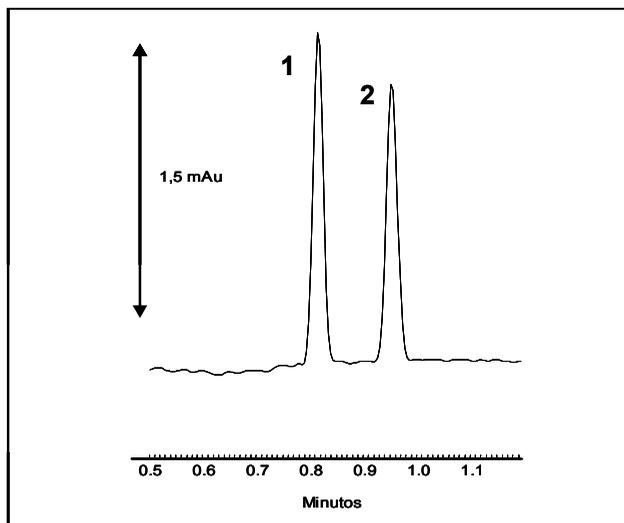


Figura 13. Eletroferograma da amostra 9 mg L^{-1} de histamina em etanol/água. 1 = imidazol (P.I). 2 = histamina. Eletrólito composto por 60 mmol L^{-1} de HIBA, 30 mmol L^{-1} de NaOH e $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de HEXA-Br em água, pH 3,88. Condições: injeção hidrodinâmica pelo lado mais próximo do detector.

4.4. Otimização do processo de extração

O Official Methods of Analysis (OMA) of AOAC INTERNATIONAL recomenda o método oficial de fluorimetria para determinação de histamina (OMA, 1995). No entanto o preparo de amostra é laborioso, tornando-o pouco adequado. Foram assim realizados testes quanto à substituição do solvente de extração do analito da matriz: de metanol grau analítico para outro, sem que houvessem perdas quanto a capacidade de extração e acarreta-se na diminuição de custos. Para tanto, foi avaliado em condições de aquecimento e com relação ao tempo necessário para a completa transferência do analito da matriz para o solvente de extração.

Para avaliação do solvente de extração comparou-se uma massa do filé de atum macerado em cadinho de porcelana dividido igualmente em três partes (cada parte com cerca de 10 gramas) e cada uma extraída com metanol (solvente utilizado no método da AOAC), etanol absoluto (solvente de teste 1) e etanol hidratado (solvente de teste 2). Eles foram mantidos sob agitação constante por 10 minutos, e depois aquecidas por 15 minutos a 60 °C, como descrito no método. Em seguida foram retiradas duas alíquotas de 1 mL de cada extração, centrifugadas e levadas para análise. Os resultados se encontram na Tabela 8.

Tabela 8. Área obtida para os diferentes solventes de extração da amostra.

Solvente	Área média
Metanol	200 ± 3,81 ^A
Etanol absoluto	263 ± 5,90 ^B
Etanol hidratado	246 ± 3,07 ^B

Dados de médias ± SD obtidos em triplicata. Resultados obtidos após teste ANOVA: [F=26,35; g.l.=2;6; p=0,001]. ^{A, B} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey (p <0,05).

Pelo teste de análise de variância ANOVA obteve-se valor de p = 0,001; ou seja, que a um nível de 95% de confiança há diferença significativa entre os resultados obtidos e por isso foi feito o teste de Tukey. Após o teste verificou-se que o valor obtido na extração com metanol era inferior e significativamente diferente do obtido tanto com a extração com etanol absoluto quanto com etanol hidratado, e que esses dois solventes não apresentaram diferença significativa, a um nível de 95% de confiança. Assim optou-se pela utilização do etanol hidratado por este apresentar um custo reduzido em relação ao absoluto.

No segundo teste foi utilizado apenas o solvente escolhido para trabalho, repetido todos os procedimentos do primeiro teste, mas com a massa dividida em apenas duas partes, até a fase de aquecimento. Neste ponto apenas uma delas foi aquecida e a outra mantida em temperatura ambiente e delas foram retiradas alíquotas para análise, em diferentes tempos. Os resultados foram então comparados para a determinação da necessidade de aquecimento e também do tempo necessário para a extração e se encontram na Tabela 9.

Tabela 9. Área obtida para os diferentes tempos de extração da amostra com e sem aquecimento.

Aquecimento	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
Sim (área)	4311 ± 1,20% ^{A,a}	8808 ± 1,04% ^{C,c}	11195 ± 0,46% ^{D,e}	15202 ± 0,92% ^{F,f}	14870 ± 1,94% ^{F,f}
Não (área)	7319 ± 0,93% ^{B,b}	10766 ± 9,38% ^{D,d}	13084 ± 0,54% ^{E,f}	14285 ± 0,62% ^{F,f}	14134 ± 0,71% ^{F,f}

Dados de médias ± SD% obtidos em duplicata. Resultados obtidos após teste ANOVA: ^{a,b,c,d,e,f} Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey (p < 0,05). ^{A, B, C, D, E, F} Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey (p < 0,05).

O teste de análise de variância ANOVA foi utilizado por ele obteve-se um valor de p = 0,01; ou seja, que a um nível de 95% de confiança há diferença significativa entre os resultados obtidos e por isso foi feito o teste de Tukey. De acordo com a Tabela 9 pode-se verificar que, a um nível de 95% de confiança, há uma estabilização da quantidade extraída após 40 minutos para a amostra onde houve aquecimento durante a extração e após 30 minutos para a amostra sem aquecimento considerando que os resultados seguintes não apresentam mais diferença significativa. Também se pode notar, com o mesmo nível de confiança, que após 40 minutos de extração, os resultados independentemente de aquecimento da amostra não apresentam diferenças significativas.

A partir desses resultados foi descartado o aquecimento da amostra, porém com necessidade de 40 minutos para a extração. Por tanto, foi feito um terceiro teste, onde se substituiu a maceração manual em cadinho de porcelana pela utilização de um “mixer” para a homogeneização da amostra. Nele utilizou-se 10 gramas de atum, adicionada do solvente escolhido (etanol hidratado), homogeneizada por cerca de 5 minutos e então retirada uma alíquota, esta então centrifugada e levada para análise, feita em triplicata. O restante foi mantido em repouso, sendo retirado dele mais três alíquotas, em tempos diferentes, para também serem centrifugadas e analisadas da mesma forma. Os resultados foram então comparados entre si para a escolha do tempo ideal de extração e se encontram na Tabela 10.

Tabela 10. Área obtida para os diferentes tempos de extração da amostra.

	0 min	10 min	20 min	30 min
Área	7445 ± 4,176%	7457± 6,980%	7426 ± 5,941%	7794 ± 2,737%

Dados de médias ± SD% obtidos em triplicata. Resultados obtidos após teste ANOVA: [F=0,61; g.l.=3;8; p=0,62].

Após a análise de variância ANOVA foi verificado que $p > 0,05$; ou seja, que a um nível de 95% de confiança não há diferença significativa entre os resultados obtidos e, portanto a extração pode ser realizada sem dependência de tempo. Sendo assim, após a substituição na forma de maceração da amostra foi possível descartar o tempo de extração, passando diretamente da homogeneização para a centrifugação e posterior análise no equipamento de CE.

4.5. Validação do método

Os dados de desempenho analítico e figuras de mérito do método proposto estão compilados na Tabela 11.

Tabela 11. Figuras de mérito do método propostos.

Analito	Área corrigida	Tempo de migração corrigido		Resolução	N	
Histamina	0,5967	1,171		1,657	23842	
Analito	Equação Linear (ax + b)		CV % (médio)	R ²	LQ (mg kg ⁻¹) ^a	LD (mg kg ⁻¹) ^a
	a	B				
Histamina	0,1796	0,0123	5,098	0,998	1,0	0,3
	Precisão intra-ensaio ^b		Precisão instrumental ^c		Precisão intermediária ^d	
	Média	(CV%)	Média	(CV%)	Média	(CV%)
Tempo	0,936	1,924	0,938	1,333	0,896	6,537
Tempo corrigido	0,872	0,149	0,884	0,088	0,869	0,801
Área	0,459	2,478	1,104	1,249	0,503	9,497

^a Concentração no capilar; ^b n = 4; ^c n = 5; ^d n = 8

4.5.1. Curva analítica, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A curva analítica utilizada apresentou coeficiente de determinação de 0,998, linearidade considerada suficiente para a quantificação proposta. A faixa estudada variou de 0,25 a 15 mg kg⁻¹ contento o padrão interno a uma concentração constante. Como a diluição da amostra é de 20 vezes, a faixa escolhida um intervalo superior ao recomendado pelas agências ANVISA e IUPAC, que são de 80% a 120% e 50% a 150%, respectivamente, levando-se em consideração o valor limitado pela legislação, que no caso da histamina é de 100 mg kg⁻¹ na média das amostras, e maior que 200 mg Kg⁻¹ em qualquer unidade da amostra . Foram calculados os limites de detecção e quantificação e apresentando valores de LD e LQ, respectivamente de 0,3 e 1,0 mg Kg⁻¹ (RIBANI, 2004). Todos os dados são apresentados na Tabela 11.

4.5.2. Precisão

Os valores de precisão intra-ensaio foram de 2,48%; 1,92% e 0,15% para área corrigida¹, tempo de migração e tempo de migração corrigido², respectivamente. Os valores de precisão inter-ensaio foram de 9,50%; 6,54% e 0,80% para área corrigida, tempo de migração e tempo de migração corrigido, respectivamente. Já os valores de precisão instrumental foram de 1,25%; 1,33% e 0,09% para área corrigida, tempo de migração e tempo de migração corrigido, respectivamente. Estes valores obtidos indicam a necessidade de repetição da construção da curva de calibração para todos os dias da análise.

4.5.3. Exatidão

O teste de recuperação foi realizado para avaliar a exatidão do método. O padrão de histamina foi adicionado diretamente sobre a amostra de peixe, antes dos processos de extração descritos acima. Foram avaliados seis diferentes níveis de histamina, nas concentrações finais de 2,5;

¹ Razão entre a área do analito e a área do padrão interno.

² Razão entre o tempo de corrida do analito e o tempo de corrida do padrão interno.

3,0; 3,5; 4,0 ;4,5 e 5,0 mg kg⁻¹. A Tabela 12 mostra os resultados para os testes de recuperação. A recuperação variou entre 99,8 106,3%.

Tabela 12. Dados obtidos a partir da recuperação da histamina na amostra de atum.

Histamina adicionada	Média áreas His/Imi ± CV%	Recuperação (%)
2,500	0,4771 ± 2,159%	106,3
3,000	0,5538 ± 0,939%	102,8
3,500	0,6325 ± 0,364%	100,6
4,000	0,7168 ± 1,004%	99,8
5,000	0,8995 ± 1,001%	100,2
Média		101,9
Desvio Padrão		2,700
CV%		2,648

4.6. Resultados das amostras

Após o método validado, utilizou-se o mesmo para a análise de amostras obtidas no comércio local, os quais se encontram na Tabela 13.

Como nenhuma das amostras frescas apresentou quantidade suficiente de histamina para ser detectada pelo método foram armazenadas duas amostras diferentes do peixe, uma com resfriamento em geladeira por 5 dias, e outra com o mesmo resfriamento, seguido por congelamento em freezer por mais 9 dias, como forma de verificar o método. Nessas duas amostras foram encontradas quantidades quantificáveis da amina biogênica em questão.

Tabela 13. Valores encontrados para as análises nas diferentes matrizes.

Tipo de amostra	[] HIS (mg.kg⁻¹)
Camarão	< LD*
Pintado	< LD*
Salmão	< LD*
Atum ralado ao natural 1	< LD*
Atum ralado ao natural 2	< LD*
Atum ralado em azeite	< LD*
Atum fresco	< LD*
Atum armazenado em geladeira	42,55
Atum armazenado em geladeira e depois con- gelado	445,9

LD* Limite de detecção

4.7. Comparação de custo com o procedimento adotado no método oficial (fluorimétrico)

Após ter sido finalizado e validado quanto aos parâmetros já abordados, o método por ECZ pode ser comparado ao método oficial quanto ao tempo de preparo e custo de solventes para o tratamento da amostra, assim como o tempo para cada análise. Os valores foram estimados para o método fluorimétrico a partir da descrição do mesmo no manual da AOAC. Os resultados encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14. Comparação entre o método fluorimétrico e o método proposto por eletroforese capilar

Parâmetro	ECZ	Fluorimétrico	Redução (%)
Tempo de análise (min)	2,67	99	97,3
Consumo de solventes no tratamento da amostra (R\$)	0,34	2,34	85,5
Tratamento da amostra (min)	5	48	89,6

Analisando os dados presentes na Tabela 12 é possível demonstrar as vantagens da eletroforese capilar quando comparada ao método fluorimétrico, com redução drástica no tempo de análise (de 2 horas e meia de análise por amostra para menos de 8 minutos). Alterações no preparo da amostra também beneficiaram esta redução, além da substituição do solvente de extração por um de menor custo e toxicidade. O método proposto por CE também possui a vantagem de não necessitar de derivatização da amostra, onde há no método fluorimétrico um gasto extra de reagentes de maior valor comercial. Em eletroforese capilar, o consumo de reagentes durante a análise é desprezível, considerando que poucos mililitros são suficientes para dezenas de análises.

5. CONCLUSÃO

A eletroforese capilar pode ser utilizada com eficiência como método alternativo para quantificar a histamina em diversos tipos de matrizes, podendo assim ser aplicado como método alternativo ao método oficial para análises desta amina biogênica em peixes e crustáceos. As condições otimizadas para isto se deram em um eletrólito de corrida composto por 60 mmol L⁻¹ de HIBA pH 3,88 ajustado com NaOH e HEXA-Br 0,25 mmol L⁻¹, capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida com 50,2 cm x 50 mm D.I. e 375 mm D.E. (10,2 cm de diâmetro efetivo), comprimento de onda em 214 nm e tempo de análise para o composto e seu padrão interno em 1 minuto. A diferença de potencial aplicado foi de -20 kV com injeção pelo lado mais próximo do detector.

As figuras de mérito do método atendem os parâmetros estipulados tanto pela ANVISA quanto pelo INMETRO, apresentando excelente seletividade, linearidade com coeficiente de correlação de 0,9983, exatidão próxima a 100 % e precisão intra ensaio e instrumental menores que 2,5.

O método de preparo de amostra também se mostrou altamente eficiente, com tempo de preparo reduzido e utilização de solventes de menor custo e toxicidade quando comparados ao método fluorimétrico (AO-AC).

As principais vantagens apresentadas pelo método desenvolvido foram o tempo reduzido e o baixo custo por análise. O baixo consumo de solventes também pode ser considerado como grande vantagem da técnica, minimizando custos com tratamento de resíduos e impacto ambiental, podendo ser considerada então como sendo ecologicamente mais correta.

6. REFERÊNCIAS

ALTRIA, Kevin D.. **Improved Performance in Capillary Electrophoresis using Internal Standards**. Lcgc Magazine, Hertfordshire, Uk., p.1-5. Disponível em:

<<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/data/articles/tandard//lcgeurope/362002/30473/article.pdf>>. Acesso em: 09 dez. 2010.

AVELAR, Érica C.; FRANÇA, Adriana S.; FERRAZ Vany P.. **Desenvolvimento e otimização de metodologia de cromatografia gasosa para identificação e quantificação de aminas bioativas em alimentos**. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. UNICAMP, 2005

BRASIL. **Ministério da Saúde. Regulamento Técnico: Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos**. Portaria nº 685, de 27/08/1998. Brasília: Ministério da Saúde, 1998.

BUSTO, O. MESTRES, M.; GUASCH, J.; BORRULL F.. **Determination of biogenic amines in wine after clean-up by solid-phase extraction**. Chromatographia, n. 7-8, v. 40, p 404-410, 1995.

CINQUINA, A.L.; LONGO, F.; CALÌ, A.; DE SANTIS, L.; BACCELLIERE, R.; COZZANI, R.. **Validation and comparison of analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples**. Journal of Chromatography A, v. 1032, p. 79–85, 2004

DRIOUICH, Rim; TAKAYANAGI, Toshio; OSHIMA, Mitsuko; MOTOMIZU, Shoji. **Separation and determination of n-alkylamines and histamine by capillary zone electrophoresis using salicylaldehyde-5-sulfonate as a derivatizing reagent**. Journal of Chromatography A, v. 934, p. 95–103, 2001.

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 , v. 1154, p. 477-480, 2007.

GUIMARÃES, Judite L.. **Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e uréia como índices químicos de qualidade e frescor do pescado**. Tese de Doutorado, UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas: 2005 (PDF)

KOVÁCSA, Agnes; SIMON-SARKADI, Livia; GANZLER, Katalin. **Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis**. Journal of Chromatography A, v. 836 p. 305–313, 1999.

KVASNICKA, Kvasnicka; VOLDRICH, Michal. **Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection.** Journal of Chromatography A, v. 1103, p.145–149, 2006.

LIU, Xin; YANG, Li-Xiang; LU, Ying-Tang. **Determination of biogenic amines by 3-(2-furoyl)quinoline-2- carboxaldehyde and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** Journal of Chromatography A, v. 998, p. 213–219, 2003.

MALE, Keith B.; LUONG, John H. T.. **Derivatization, stabilization and detection of biogenic amines by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis–laser-induced fluorescence detection.** Journal of Chromatography A, v. 926, p. 309–317, 2001.

OGURI, Shigeyuki; WATANABE, Seiko; ABE, Shinobu. **Determination of histamine and some other amines by highperformance capillary electrophoresis with on-line mode in-capillary derivatization.** Journal of Chromatography A, v 790, p.177–183, 1997.

OMA – Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. Fish and Other Marine Products. 35: p. 16-17, 1995

[29] RIBANI, Marcelo; BOTTOLI, Carla B. G.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F.; MELO, Lúcio F. C.. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova, São Paulo, p. 771-780. set. 2004.

ÖNAL, Armagan. **A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods.** Food Chemistry, v 103, p 1475–1486, 2007.

ROSSANO, Rocco; MASTRANGELOA, Lina; UNGAROB, Nicola; RICCIOET, Paolo. **Influence of storage temperature and freezing time on histamine.** Journal of Chromatography B, v. 830, p. 161–164, 2006.

WILLIAMS, Robert L.; VIGH, Gyula. **Polyethylene glycol mono-methyl ether sulfate-based background electrolytes in capillary electrophoresis.** Journal Of Chromatography A, v. 744, p.75-80, 1996.

ZHANG, Li-Yao; SUN, Meng-Xiang. **Determination of histamine and histidine by capillary zone electrophoresis with pre-column naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection.** Journal of Chromatography A, v 1040, p. 133–140, 2004.

ZHANG, Li-Yao; TANG, Xing-Chun; SUN, Meng-Xiang. **“Simultaneous determination of histamine and polyamines by capillary zone electrophoresis with 4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatization and fluorescence detection.** Journal of Chromatography B, v. 820, p. 211–219, 2005.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho obteve-se três novos métodos por eletroforese capilar na análise alimentos, com potencialidade para servirem como alternativos ou complementares às técnicas já existentes e consolidadas, e com vantagens como tempo e custo, além de mais adequados ambientalmente, podendo ser empregados em análises de rotina.

Na análise de leite e leite de soja, o método desenvolvido mostrou-se simples, rápido e eficiente para a determinação de cátions inorgânicos, com pré-tratamento da amostra bastante simples, constituído de acidificação e centrifugação. Os valores encontrados foram bastante similares para os diferentes tipos de leite, comprovando a possibilidade de substituição do mesmo de origem animal (vaca) pelo de origem vegetal (soja), sem perda nutricional referente aos íons analisados. O método desenvolvido baseado em eletroforese capilar, com detecção indireta por UV-vis pode ser usado como alternativo aos métodos baseados em espectroscopia de absorção atômica (AAS).

Na análise de alface, um método simples, rápido e confiável para a determinação de nitrito e nitrato foi desenvolvido. Este se apresenta como alternativa em análises de rotina para atestar a qualidade de alfaves hidropônicos, por apresentar um desempenho analítico eficiente em um tempo de análise extremamente curto, de baixo custo e que envolve um tratamento de amostra bastante simplificado. Foi possível empregar um novo método para a verificação e determinação da mobilidade iônica dos compostos de maneira simples e rápida, sem a necessidade prévia de variáveis como campo elétrico, força iônica, tamanho do capilar e mobilidade do fluxo eletrosmótico, que não entram na equação utilizada. Esta vantagem torna o procedimento extremamente útil no desenvolvimento de métodos por eletroforese capilar.

Em peixes e crustáceos, a eletroforese capilar pode ser utilizada com eficiência como método alternativo para quantificar a histamina, podendo assim ser aplicado como método alternativo ao método oficial para análises desta amina biogênica em diversas matrizes. O método de preparo de amostras também se mostrou altamente eficiente, com tempo de preparo reduzido e utilização de solventes de menor custo e toxicidade quando comparados ao método fluorimétrico (AOAC). As principais vantagens apresentadas pelo método desenvolvido foram o tempo reduzido e o baixo custo por análise. O baixo consumo de solventes também pode ser considerado como grande vantagem da técnica, minimizando custos com tratamento de resíduos e impacto ambiental, podendo ser considerada então como sendo ecologicamente mais correta.

As informações adquiridas neste trabalho confirmam a potencialidade dos métodos desenvolvidos para a eletroforese capilar na análise de alimentos, demonstrando a importância do desenvolvimento de novas metodologias para a técnica a fim de suprir as atuais demandas por alimentos seguros e de alta qualidade.