



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Química Analítica

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATO, NITRITO E N-NITROSAMINAS EM PRODUTOS CÁRNEOS

Tese de doutorado apresentada
por **Raquel Andrade** ao Programa de Pós-
Graduação em Química do Departamento
de Química Analítica da Universidade
Estadual de Campinas, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath

Co-orientador: Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Campinas, Outubro de 2004.

Ficha Calalográfica

BANCA EXAMINADORA

A Deus.

Aos meus pais, às minhas irmãs, ao Aquino

Ao Guilherme.

Por todo amor, apoio e compreensão.

Agradecimentos

- ❖ Em primeiro lugar a Deus, pela presença sempre constante na minha vida.
- ❖ A minha família que me apoiou de todas as maneiras e concepções em todas as etapas da minha vida.
- ❖ Ao Guilherme, meu amor, pelo carinho e compreensão em todos os momentos.
- ❖ À professora Susanne Rath, com quem tive o privilégio de conviver, pela excelente orientação e pelo carinho. Ficam expressos o meu mais profundo agradecimento e minha admiração por sua confiança e, principalmente, por sua amizade.
- ❖ Ao professor Felix Guillermo Reyes Reyes, pela valiosa colaboração, disponibilidade, competência, amizade e convivência.
- ❖ Ao Professor Aleixo (*in memoriam*) pelos momentos de convivência e presença constante no laboratório.
- ❖ Aos amigos do Laboratório do IQ, Regiane Gregório, Regiane Favaron, Cláudia, Luciane, Rosângela, Marcelo, Gyda, Socorro, Paula, Gabriella, Mônica e Eduardo, pela agradável convivência e pela ajuda no que foi necessário durante o desenvolvimento do trabalho e também a todos os amigos que demonstraram apoio e confiança.
- ❖ Ao pessoal do laboratório de Toxicologia da FEA, Silvane, Elide, Camila e Sílvia Helena, pela amizade e apoio.

- ❖ À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química, pela oportunidade concedida.
- ❖ À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.
- ❖ Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) pelo uso de equipamentos.
- ❖ Ao Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pelo uso das instalações.
- ❖ A todos que de alguma forma acreditaram e contribuíram e estiveram presentes durante todo esse meu trabalho, o meu **muito obrigada!!!!**

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Doutorado em Ciências (Química Analítica) – IQ / UNICAMP
"Desenvolvimento de métodos para determinação de nitrato, nitrito e N-nitrosaminas em carnes curadas", 2004, sob orientação da Profa. Dra. Susanne Rath.
- Mestrado em Agroquímica (Química Analítica Ambiental) - UFV - Viçosa, MG.
"Adsorção de produtos de degradação do dissulfoton por frações de solo associadas a um material orgânico", 2000, sob orientação da Profa. Dra. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.
- Graduação em Química Industrial pela Universidade Vale do Rio Doce, UNIVALE - Governador Valadares, MG.

ARTIGOS PUBLICADOS

Andrade, R.; Viana, C.O.; Guadagnin, S.G.; Reyes, F.G.R.; Rath, S. *A flow-injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide generation*, Food Chemistry, v.80, p. 597-602, 2003.

Andrade, R.; Rath, S.; Reyes, F.G.R.. *A method for the determination of volatile N-nitrosamines in food by HS-SPME-GC-TEA*. Food Chemistry, *in press*.

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

Apresentação em painel: XII Encontro Regional da SBQ/MG, UFOP – MG, realizado de 28 à 30/10/98, "*Estudos da adsorção dos metais pesados Cu²⁺ e Zn²⁺ em solos da região de Viçosa (MG)*".

Apresentação em painel: XIII Encontro Regional da SBQ/MG, Fundação de Ensino Superior de São João Del Rei – MG), realizado de 03 a 05/11/99, *“Adsorção dos produtos finais de degradação do dissulfoton em solo”*.

Apresentação em painel: XIII Encontro Regional da SBQ/MG, Fundação de Ensino Superior de São João Del Rei – MG), realizado de 03 a 05/11/99, *“Otimização da técnica de extração de dissulfoton e triadimenol em água”*.

Apresentação em painel: 23ª Reunião Anual da SBQ (Poços de Caldas - MG), realizada de 23 a 26/05/00, *“Estudo da adsorção dos produtos de degradação do dissulfoton por matrizes de solos associadas a um material orgânico seco”*.

Apresentação em painel e oral: VII Encontro Nacional sobre Contaminantes Inorgânicos e II Simpósio sobre essencialidade de elemento na nutrição humana (Instituto de Tecnologia de Alimentos – Campinas – SP), realizado de 25 a 27/10/00, *“Determinação de nitrato pelo complexo FeSCNNO^+ em sistema FIA”*.

Apresentação em painel: 24ª Reunião Anual da SBQ (Poços de Caldas - MG), realizada de 28 a 31/05/01, *“Efeito do tempo de incubação na adsorção dos produtos finais de degradação do dissulfoton em matrizes de solo”*.

Apresentação em painel: 11º Encontro Nacional de Química Analítica (Campinas - SP), realizada de 18 a 21/09/01, *“Efeito de um material orgânico e do tempo de incubação na adsorção dos produtos finais de degradação do dissulfoton”*.

Apresentação em painel: IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (Campinas - SP), realizado de 12 a 15/11/01, *“Avaliação da mandioca e seus resíduos industriais em substituição ao milho – Efeitos sobre a composição muscular e perfil de ácidos graxos de novilhas confinadas”*.

Apresentação em painel: IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (Campinas - SP), realizado de 12 a 15/11/01, *“Determinação de nitrato e nitrito em amostras de embutidos através do complexo FeSCNNO^+ , por FIA”*.

Apresentação em painel: V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (Campinas - SP), realizado de 03 a 06/11/03, *“Desenvolvimento de métodos para a determinação de Nitrosaminas voláteis por HS-SPME-GC-TEA”*.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATO, NITRITO E N-NITROSAMINAS EM PRODUTOS CÁRNEOS

As N-nitrosaminas são compostos N-nitrosos formados em determinados alimentos pela reação de agentes nitrosantes, derivados de sais de nitrito ou óxido nítrico, com substâncias contendo um grupo amino. A maioria das nitrosaminas testadas em animais apresentam propriedades carcinogênicas, teratogênicas, mutagênicas e agem transplacentalmente. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar métodos para a determinação de nitrato, nitrito e N-nitrosaminas em produtos cárneos, em particular, lingüiça e salsicha. A metodologia proposta para a determinação de nitrito e nitrato foi a análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica em 460 nm. O método foi baseado na redução do nitrito e nitrato a NO, com subsequente reação com Fe(II) e tiocianato em meio ácido formando FeSCNNO^+ . Para a determinação de nitrosaminas voláteis (nitrosodimetilamina, nitrosodietilamina, nitrosopiperidina e nitrosopirrolidina), foram desenvolvidos métodos baseados em cromatografia gasosa com detetor de quimiluminescência (GC-TEA) e de massas para a quantificação e confirmação de identidade, respectivamente. Para a extração das nitrosaminas, foram avaliadas a extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida com amostragem no headspace (HS-SPME). O procedimento de SPME foi avaliado para duas fibras (PDMS-DVB e poliacrilato) e otimizado por planejamento experimental, onde foram considerados os seguintes parâmetros: força iônica, tempo de equilíbrio, tempo e temperatura de extração. Os métodos desenvolvidos foram validados mediante avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, recuperação, repetibilidade, limite de detecção e limite de quantificação e aplicado na análise de amostras de salsicha e lingüiça tipo frescal.

Palavras-chave: *Nitrato, nitrito, nitrosaminas voláteis, FIA, HS-SPME-GC-TEA, produtos cárneos.*

ABSTRACT

ANALYTICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF NITRATE, NITRITE AND N-NITROSAMINES IN MEAT PRODUCTS

Nitrosamines are N-nitroso compounds formed in certain foods by the reaction of a nitrosating agent, derived from either nitrite salts or nitrogen oxide, with a substance having an amino group. The majority of nitrosamines tested in animals are carcinogenic, mutagenic, teratogenic and act transplacentally. This work describes analytical methods for the determination of nitrate, nitrite and N-nitrosamines in meat products, in particular, sausages. Nitrite and nitrate were determined by flow injection analysis with spectrophotometric detection at 460 nm. The method is based on the reduction of nitrite and nitrate to nitric oxide, with subsequent reaction with iron (II) and thiocyanate in an acid medium, forming FeSCNNO^+ . The determination and identity confirmation of volatile nitrosamines (nitrosodimethylamine, nitrosodiethylamine, nitrosopiperidine and nitrosopyrrolidine) were carried out by gas chromatography with a thermal energy analyzer or mass detector, respectively. Solid phase extraction (SPE) and solid phase microextraction with headspace sampling (HS-SPME) for the extraction of the nitrosamines were evaluated. Two fiber coatings (PDMS-DVB and polyacrylate) were evaluated and the conditions optimized by an experimental design; the ionic strength, equilibrium time, extraction time and temperature were considered. The methods developed were validated through the following parameters: linear range, linearity, sensitivity, precision, limit of detection and limit of determination, and accuracy and were applied in the analysis of nitrate, nitrite and volatile nitrosamines in sausages.

Keywords: *Nitrate, nitrite, volatile nitrosamines, FIA, HS-SPME-GC-TEA, meat products.*

ÍNDICE GERAL

<i>Descrição</i>	<i>Página</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxvii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
I.1 INTRODUÇÃO	3
CAPÍTULO II – OBJETIVOS	5
II.1 OBJETIVOS	7
CAPÍTULO III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
III.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE NITRATO, NITRITO E N-NITROSAMINAS	11
III.1.1 NITRATO E NITRITO	11
III.1.2 N-NITROSAMINAS	12
III.2 OCORRÊNCIA DE NITRATO, NITRITO E N-NITROSAMINAS EM ALIMENTOS	16
III.2.1 NITRATO E NITRITO	16
III.2.2 N-NITROSAMINAS	20
III.3 DADOS DE EXPOSIÇÃO DE NITRATO, NITRITO E N-NITROSAMINAS	21
III.3.1 NITRATO E NITRITO	21
III.3.2 N-NITROSAMINAS	24
III.4 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS	26
III.4.1 NITRATO E NITRITO	26
III.4.2 N-N-NITROSAMINAS	29
III.5 ASPECTOS DE LEGISLAÇÃO	30

III.5.1	NITRATO E NITRITO	30
III.5.2	N-NITROSAMINAS	31
III.6	ASPECTOS ANALÍTICOS NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO, NITRITO E N-NITROSAMINAS	32
III.6.1	NITRATO E NITRITO	32
III.6.1.1	PREPARO DA AMOSTRA NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO	33
III.6.1.2	DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO	34
III.6.2	N-NITROSAMINAS	37
III.6.2.1	PREPARO DE AMOSTRAS NA DETERMINAÇÃO DE N-N-NITROSAMINAS VOLÁTEIS	38
III.6.2.1.1	EXTRAÇÃO COM SOLVENTE	39
III.6.2.1.2	EXTRAÇÃO EM FASE-SÓLIDA	41
III.6.2.1.3	MICROEXTRAÇÃO EM FASE-SÓLIDA	43
III.6.2.1.4	EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO	45
III.6.2.2	DETERMINAÇÃO DE N-NITROSAMINAS	47
	CAPÍTULO IV – DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO POR FIA COM DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA	49
IV.1	INTRODUÇÃO	51
IV.2	OBJETIVO	52
IV.3	PARTE EXPERIMENTAL	52
IV.3.1	EQUIPAMENTOS	52
IV.3.2	REAGENTES	53
IV.3.3	AMOSTRAS	53
IV.3.4	PREPARO DE SOLUÇÕES	53
IV.3.4.1	SOLUÇÃO BÁSICA (C1)	53
IV.3.4.2	SOLUÇÃO DE FERRO (II) (R1)	54
IV.3.4.3	SOLUÇÃO DE TIOCIANATO (R2)	54

IV.3.4.4	SOLUÇÃO PADRÃO ESTOQUE DE NITRITO	54
IV.3.4.5	SOLUÇÕES PADRÃO DE TRABALHO DE NITRITO	54
IV.3.4.6	SOLUÇÃO PADRÃO ESTOQUE DE NITRATO	55
IV.3.4.7	SOLUÇÕES PADRÃO DE TRABALHO DE NITRATO	55
IV.3.4.8	SOLUÇÃO DE ACETATO DE ZINCO	55
IV.3.4.9	SOLUÇÃO DE HEXACIANO FERRATO DE POTÁSSIO	55
IV.3.5	SISTEMA FIA	56
IV.3.5.1	OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA FIA NA DETERMINAÇÃO DE NITRITO	56
IV.3.5.2	OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA FIA NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO	60
IV.3.6	PREPARO DE AMOSTRA	64
IV.3.6.1	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DE NITRATO E NITRITO	64
IV.3.6.2	ESTUDO DA ESTABILIDADE DO NITRATO E NITRITO NA AMOSTRA PREVIAMENTE TRITURADA	64
IV.3.6.3	ESTUDO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO	65
IV.3.7	ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PRODUTOS CÁRNEOS	65
IV.3.7.1	EXTRAÇÃO DO NITRATO E NITRITO DA MATRIZ E CLARIFICAÇÃO DO EXTRATO	65
IV.3.7.2	DETERMINAÇÃO DO NITRATO E NITRITO POR FIA	66
IV.3.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	66
IV.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
IV.4.1	DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM SISTEMA FIA	69
IV.4.1.1	OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA FIA NA DETERMINAÇÃO DE NITRITO	70
IV.4.1.2	OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA FIA NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO	74
IV.4.1.3	EFEITO MATRIZ NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM AMOSTRAS DE EMBUTIDOS	78
IV.4.1.3.1	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DE NITRATO E NITRITO	79
IV.4.1.3.2	ESTUDO DA ESTABILIDADE DO NITRATO E NITRITO NA AMOSTRA PREVIAMENTE TRITURADA	80

IV.4.1.3.3	ESTUDO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO	82
IV.4.1.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO FIA	83
IV.5	CONCLUSÃO	86
 CAPÍTULO V – ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES		87
CROMATOGRÁFICAS PARA SEPARAÇÃO DAS N-		
NITROSAMINAS VOLÁTEIS POR GC-TEA E GC-MS		
V.1	INTRODUÇÃO	89
V.2	OBJETIVOS	90
V.3	PARTE EXPERIMENTAL	90
V.3.1	INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	90
V.3.1.1	CROMATOGRAFIA GASOSA – DETETOR TEA	90
V.3.1.2	CROMATOGRAFIA GASOSA – DETETOR MS	91
V.3.2	PADRÕES ANALÍTICOS	92
V.3.3	SOLVENTES E REAGENTES	92
V.3.4	SOLUÇÕES	92
V.3.4.1	SOLUÇÃO ESTOQUE DE NDMA, NDEA, NPIP, NPIR E NPBA	92
V.3.4.2	SOLUÇÕES DE TRABALHO DE NDMA, NDEA, NPIP, NPIR E NPBA	92
V.3.4.3	SOLUÇÕES PARA CURVA ANALÍTICA DE 5 A 60 ng mL ⁻¹	93
V.3.4.4	SOLUÇÕES PARA CURVA ANALÍTICA DE 10 A 110 ng mL ⁻¹	93
V.3.4.5	SOLUÇÕES PARA CURVA ANALÍTICA DE 50 A 500 ng mL ⁻¹	94
V.3.5	ADEQUABILIDADE DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO	94
V.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
V.4.1	DETERMINAÇÃO DE N-N-NITROSAMINAS POR GC-TEA	95
V.4.2	DETERMINAÇÃO DE N-NITROSAMINAS POR GC-MS	100
V.5	CONCLUSÕES	105

CAPÍTULO VI - DETERMINAÇÃO DE N-NITROSAMINAS POR SPE E SPME-GC-TEA	107
VI.1 INTRODUÇÃO	109
VI.2 OBJETIVOS	111
VI.3 PARTE EXPERIMENTAL	111
VI.3.1 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	111
VI.3.1.1 CROMATOGRAFIA GASOSA – DETETOR TEA	111
VI.3.1.2 CROMATOGRAFIA GASOSA – DETETOR MS	112
VI.3.2 EQUIPAMENTOS	112
VI. 3.3 MATERIAL PARA SPE	113
VI. 3.4 MATERIAL PARA SPME	113
VI.3.5 REAGENTES E PADRÕES	113
VI.3.6 PREPARO DE SOLUÇÕES	114
VI.3.7 AMOSTRAS	114
VI.3.8 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	115
VI.3.8.1 PREPARO DE AMOSTRAS	115
VI.3.8.2 PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	115
VI.3.8.2.1 ANÁLISE DE AMOSTRAS UTILIZANDO SPE	116
VI.3.8.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SPME-GC-TEA	117
VI.3.8.3.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	118
VI.3.8.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO HS-SPME-GC-TEA	122
VI.3.8.6 ANÁLISE DE AMOSTRAS POR HS-SPME-GC-TEA	123
VI.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	123
VI.4.1 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRAS	123
VI.4.1.1 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	124
VI.4.1.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	128
VI.4.1.2.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	130
VI.4.1.2.2 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	138

VI.4.1.2.3	ANÁLISE DE AMOSTRAS POR HS-SPME-GC-TEA	140
VI.5	CONCLUSÕES	142
CAPÍTULO VII – CONCLUSÕES GERAIS		143
CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		147

LISTA DE ABREVIATURAS

DVB	Divinilbenzeno
DI-SPME	Do inglês “Direct Imersion-Solid Phase Microextraction” Microextração em fase-sólida por imersão direta
FAO/WHO	Do inglês “Food and Agriculture Organization/World Health Organization” Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial da Saúde
FIA	Do inglês “Flow Injection Analysis” Análise por Injeção em Fluxo
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Do inglês “Gas Chromatography – Mass Spectrometry” Cromatografia gasosa - Detetor de massa
GC-TEA	Do inglês “Gas Chromatography - Thermal Energy Analyser” Cromatografia gasosa – Detetor de Quimiluminescência
HPLC	Do inglês “High-Performance Liquid Chromatography” Cromatografia líquida de alta eficiência
HS	Do inglês “Headspace” Espaço confinante
HS-SPME	Do inglês “Headspace - Solid Phase Microextraction” Microextração em fase-sólida com amostragem no “headspace”
IDA	Ingestão Diária Aceitável
II	Íons de Identificação
IQ	Íons de Quantificação
LLE	Do inglês “Liquid-liquid Extraction” Extração líquido – líquido

MS	Do inglês “Mass Spectrometry” Espectrometria de massa
NDBA	N-Nitrosodibutilamina
NDBzA	N-Nitrosodibenzilamina
NDEA	N-Nitrosodietilamina
NDMA	N-Nitrosodimetilamina
NHPIR	N-Nitrosohidroxipirrolidina
NPBA	N-Nitrosopropilbutilamina
NPIP	N-Nitrosopiperidina
NPIR	N-Nitrosopirrolidina
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
SFE	Do inglês “Supercritical Fluid Extraction” Extração por Fluido Supercrítico
SIM	Do inglês “Selected Ion Monitoring” Monitoramento de um íon selecionado
SPE	Do inglês “Solid Phase Extraction” Extração em fase-sólida
SPME	Do inglês “Solid Phase Microextraction” Microextração em fase-sólida
TEA	Do inglês “Thermal Energy Analyser” Detetor de Quimiluminescência
USDA	Do inglês “United State Department of Agriculture” Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
WHO	Do inglês “World Health Organization” Organização Mundial da Saúde

LISTA DE TABELAS

Nº	Descrição	Página
III.1	Teores mínimo e máximo de nitrato e nitrito em alimentos.	23
III.2	Teores mínimo e máximo de nitrosaminas em alimentos ($\mu\text{g kg}^{-1}$).	25
III.3	Técnicas analíticas empregadas na determinação de nitrato e nitrito.	34
III.4	Métodos publicados para determinações de nitrato e nitrito.	37
IV.1	Estudo do efeito da concentração de $\text{Fe(II)/H}_2\text{SO}_4$ na formação do complexo ternário FeSCNNO^+ .	57
IV.2	Estudo do efeito da concentração de SCN^- na formação do complexo ternário FeSCNNO^+ .	57
IV.3	Estudo do efeito da concentração de H_2SO_4 na formação do complexo ternário FeSCNNO^+ .	58
IV.4	Estudo da influência do volume da alça de amostragem na formação do complexo ternário FeSCNNO^+ .	58
IV.5	Estudo da influência do comprimento da bobina de reação na formação do complexo ternário FeSCNNO^+ .	59
IV.6	Estudo da influência da vazão dos reagentes na formação do complexo ternário FeSCNNO^+ .	59
IV.7	Influência da diluição da solução básica na redução do nitrato a nitrito pela coluna de cádmio de 5 cm x 3 mm.	62
IV.8	Influência do pH da solução básica na redução do nitrato a nitrito pela coluna de cádmio de 5 cm x 3 mm.	62
IV.9	Influência das dimensões da coluna de cádmio utilizada na redução do nitrato a nitrito.	63
IV.10	Influência da vazão da solução básica utilizada na redução do nitrato a nitrito.	63

IV.11	Efeito da diluição da solução básica na redução do nitrato a Nitrato.	75
IV.12	Recuperação média (n=3) de nitrato e nitrito em amostras de embutidos para dois níveis de fotificação (30 e 60%).	78
IV.13	Recuperação média (n=3) de nitrato e nitrito por extração em água à temperatura ambiente e água à 70 °C na análise de amostras de lingüiças.	79
IV.14	Recuperação média (n=3) de nitrato e nitrito por extração em água à temperatura ambiente e água à 70 °C na análise de amostras de salsichas.	80
IV.15	Teores de nitrato e nitrito em amostras congeladas de salsicha ao longo de 28 dias (n = 3).	81
IV.16	Teores de nitrato e nitrito em amostras congeladas de lingüiça ao longo de 28 dias (n = 3).	82
IV.17	Parâmetros de validação para o método proposto.	84
IV.18	Comparação do método desenvolvido com o método oficial da AOAC.	85
V.1	Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico.	97
V.2	Parâmetros analíticos obtidos na detecção de N-nitrosaminas usando GC-TEA.	99
V.3	Íons utilizados na programação do detetor de massas no modo SIM para determinação de nitrosaminas.	101
V.4	Parâmetros analíticos para a determinação de nitrosaminas por GC-MS.	104
VI.1	Parâmetros experimentais estudados para se determinar o intervalo entre os níveis.	119
VI.2	Codificação dos fatores.	120
VI.3	Ensaio do planejamento experimental para otimização das condições operacionais da fibra de PDMS-DVB na extração de N-nitrosaminas.	121

VI.4	Teste de recuperação avaliando diferentes solventes na eluição da NDMA, NDEA, NPIP E NPIR ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) do cartucho de sílica.	124
VI.5	Teste de recuperação avaliando diferentes solventes na eluição da NDMA, NDEA, NPIP E NPIR ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) do cartucho de Florisil.	125
VI.6	Teste de recuperação avaliando diferentes solventes na eluição da NDMA, NDEA, NPIP E NPIR ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) do cartucho de Alumina-A.	125
VI.7	Recuperação das nitrosaminas em amostras fortificadas de lingüiça. Extração por SPE em cartucho contendo florisil.	126
VI.8	Parâmetros ótimos de extração por HS-SPME-GC-TEA para cada nitrosamina.	134
VI.9	Sensibilidade para diferentes modos de análise.	137
VI.10	Parâmetros de validação para a determinação de nitrosaminas em lingüiças por HS-SPME-GC-TEA.	138
VI.11	Resultados da determinação de NDMA em amostras de lingüiças tipo frescal.	140

LISTA DE FIGURAS

Nº	Descrição	Página
I.1	Fórmula estrutural da NDMA (Nitrosodimetilamina), NDEA (Nitrosodietilamina), NPIP (Nitrosopiperidina) e NPIR (Nitrosopirrolidina).	4
III.1	Equilíbrios químicos envolvidos na formação de espécies nitrosantes.	13
III.2	Reação de inibição da reação de nitrosação.	15
III.3	Reações redox envolvendo o nitrato.	19
III.4	Formação de metamoglobina pelo nitrito e sua conversão a hemoglobina.	27
IV.1	Sistema FIA para a determinação de nitrito.	56
IV.2	Sistema FIA para a determinação de nitrato.	61
IV.3	Influência da concentração de Fe(II) na formação do complexo ternário. Influência da concentração de SCN^- : $0,24 \text{ mol L}^{-1}$ e NO_2^- : $3,0 \text{ mg L}^{-1}$.	71
IV.4	Influência da concentração de SCN^- na formação do complexo ternário. Fe(II): $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,060 \text{ mol L}^{-1}$ e NO_2^- : $3,0 \text{ mg L}^{-1}$.	71
IV.5	Influência da concentração de H_2SO_4 na formação do complexo ternário. Fe(II): $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, SCN^- : $0,40 \text{ mol L}^{-1}$ e NO_2^- : $3,0 \text{ mg L}^{-1}$.	72
IV.6	Influência do comprimento da bobina da reação na formação do complexo ternário. Fe(II) $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,060 \text{ mol L}^{-1}$, SCN^- $0,36 \text{ mol L}^{-1}$ e NO_2^- $3,0 \text{ mg L}^{-1}$.	72
IV.7	Curva analítica para o nitrito determinado no sistema FIA (n=3).	73

IV.8	(A) Vazão da solução; (B) Influência do pH da solução C ₁ na formação do complexo FeSCNNO ⁺ ; (C) Comprimento da coluna de cádmio.	76
IV.9	Curva analítica para o nitrato determinado no sistema FIA (n=3).	77
IV.10	Teores de nitrato e nitrito no extrato de lingüiça congelada por um período de 28 dias.	83
V.1	Cromatograma de uma solução padrão contendo 50 ng mL ⁻¹ de 1-NDMA (t _R = 2,3 min.); 2-NDEA (t _R = 3,21 min.); 3-NPBA (t _R = 5,1 min.); 4-NPIP (t _R = 6,3 min.) e 5-NPIR (t _R = 6,7 min.).	96
V.2	Curvas analíticas (GC-TEA) para as nitrosaminas: NDMA, NDEA, NPIR e NPIP.	98
V.3	Cromatograma (GC-MS) de uma solução padrão contendo NDMA, NDEA, NPBA, NPIP e NPIR com 1- NDMA t _R = 8,70 min.; 2- NDEA t _R = 10,79 min.; 3- NPBA t _R = 17,01min.; 4- NPIP t _R = 19,43 min. e 5- NPIR t _R = 20,32 min.	101
V.4	Espectro de fragmentação obtido por GC MS do padrão analítico NDMA (100 ng mL ¹).	102
V.5	Espectro de fragmentação obtido por GC MS do padrão analítico NDEA (100 ng mL ¹).	102
V.6	Espectro de fragmentação obtido por GC MS do padrão analítico NPIP (100 ng mL ¹).	103
V.7	Espectro de fragmentação obtido por GC-MS do padrão analítico NPIR (100 ng mL ⁻¹).	103
V.8	Curvas analíticas (GC-MS) para as nitrosaminas: NDMA, NDEA, NPIR e NPIP.	104
VI.1	Foto do sistema empregado para a microextração em fase sólida. Do lado esquerdo aparece o banho de recirculação de água (1) acoplado num pequeno reator encamisado (2) e do lado direito o frasco dentro do banho do reator com a fibra inserida e sob uma placa de agitação magnética.	118

VI.2	Cromatograma obtido por GC-TEA de uma amostra de linguiça fortificada com 50 ng mL ⁻¹ de 1-NDMA (t _R = 2,3 min.); 2-NDEA (t _R = 3,2 min.); 3-NPBA (t _R = 5,1 min.); 4-NPIP (t _R = 6,3 min.) e 5-NPIR (t _R = 6,7 min.) e extraídas por SPE.	127
VI.3	Comparação da fibra PDMS-DVB e PA na extração de nitrosaminas.	129
VI.4	Influência da adição de sal na extração das nitrosaminas por HS-SPME, empregando a fibra PDMS-DVB.	130
VI.5	Influência do tempo de equilíbrio na extração das nitrosaminas por HS-SPME, empregando a fibra PDMS-DVB.	131
VI.6	Influência da temperatura na extração das nitrosaminas por HS-SPME, empregando a fibra PDMS-DVB.	131
VI.7	Influência do tempo de extração das nitrosaminas por HS-SPME, empregando a fibra PDMS-DVB.	132
VI.8	Superfície de resposta para NDMA obtida no planejamento fatorial completo 2 ² . Massa de NDMA x tempo de extração x temperatura.	135
VI.9	Superfície de resposta para NDEA obtida no planejamento fatorial completo 2 ² . Massa de NDEA x tempo de extração x temperatura.	135
VI.10	Superfície de resposta para NPIP obtida no planejamento fatorial completo 2 ² . Massa de NPIP x tempo de extração x temperatura.	136
VI.11	Superfície de resposta para NPIR obtida no planejamento fatorial completo 2 ² . Massa de NPIR x tempo de extração x temperatura.	136
VI.12	Curvas de adição padrão para a NDMA, NDEA, NPIP e NPIR.	139
VI.13	Cromatograma obtido por HS-SPME-GC-TEA de uma amostra de linguiça (m = 2,5 g) fortificada com 600 ng de 1-NDMA (t _R = 2,3 min.); 2-NDEA (t _R = 3,2 min.); 4-NPIP (t _R = 6,3 min.); 5-NPIR (t _R = 6,7 min.) e 360 ng de 3-NPBA (t _R = 4,5 min.).	141

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

I.1- INTRODUÇÃO

Os compostos N-nitrosos e, em particular, as N-nitrosaminas, são potentes carcinógenos, além de apresentarem ação teratogênica e mutagênica em animais de laboratório. As N-nitrosaminas podem ser formadas durante o processamento de alimentos, bem como, *in vivo*, no trato gastrintestinal, pela nitrosação de aminas secundárias, as quais podem estar associadas com um alto risco de câncer gástrico, hepático e de esôfago. De modo geral, os alimentos crus tais como vegetais, carnes, peixes, frutas, cereais e produtos lácteos contêm baixos teores de N-nitrosaminas, muitas vezes próximos ao limite de detecção da metodologia analítica empregada. No entanto, o processo de cura, onde se adiciona nitrito e/ou nitrato, pode elevar consideravelmente o nível de nitrosaminas, entre as quais se destacam a nitrosodimetilamina (NDMA), nitrosopirrolidina (NPIR), nitrosodietilamina (NDEA), nitrosopiperidina (NPIP), nitrosomorfolina (NMOR), nitrosotiazolidina (NTHZ) e nitrosoprolina (NPRO). A concentração residual de nitrito controla a formação de N-nitrosaminas em alimentos.

O uso de aditivos alimentares, como o nitrito e nitrato, não é controlado rigorosamente no Brasil como acontece em países como os Estados Unidos. Em segundo lugar, e talvez o mais importante, o Brasil tem inúmeros alimentos típicos, assim como situações diferenciadas de processamento de alimentos que propiciam a formação de N-nitrosaminas (processamento caseiro de bacon, elaboração e comercialização de lingüiças de preparo tipo caseiro).

Portanto, o tema deste trabalho é o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de nitrato, nitrito e N-nitrosaminas como: NDMA, nitrosodimetilamina, NDEA, nitrosodietilamina, NPIP, nitrosopiperidina e NPIR, nitrosopirrolidina (Figura I.1) em produtos cárneos.

A tese está compreendida em 8 capítulos, sendo que neste capítulo I está sendo apresentado o assunto e a forma geral de organização deste trabalho.

No capítulo II são apresentados os objetivos gerais e específicos da tese e no capítulo III uma revisão bibliográfica englobando os assuntos de interesse.

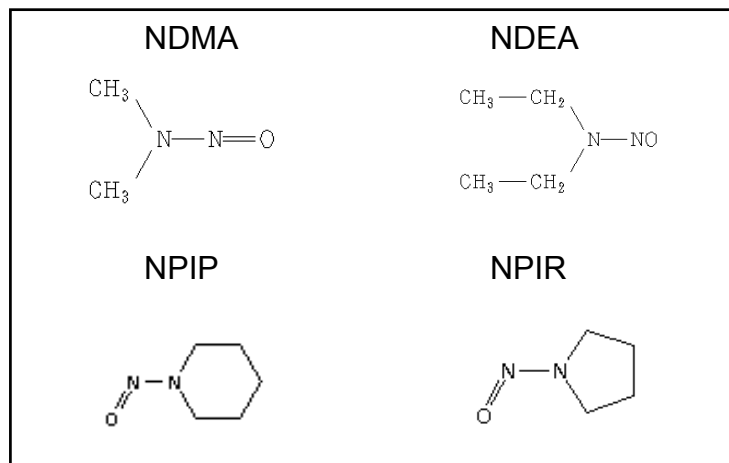


Figura I.1- Fórmula estrutural da NDMA (Nitrosodimetilamina), NDEA (Nitrosodietilamina), NPIP (Nitrosopiperidina) e NPIR (nitrosopirrolidina).

O desenvolvimento e validação da metodologia analítica para determinação de nitrato e nitrito através de um sistema de injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica são discutidos no capítulo IV.

No capítulo V é apresentado o estabelecimento das condições cromatográficas através do uso de cromatografia gasosa com detetor de quimiluminescência e detetor de massas, visando a separação e quantificação das N-nitrosaminas voláteis.

Duas técnicas de preparo de amostras para extração das N-nitrosaminas voláteis em produtos cárneos foram avaliadas, cujos resultados estão apresentados no capítulo VI: uma baseada na extração com solventes e posterior limpeza e pré-concentração por extração em fase sólida e outra que dispensa a utilização de solventes, que é a microextração em fase sólida.

Finalizando, no capítulo VII estão apresentadas as conclusões finais de todo o trabalho, e no capítulo VIII estão dispostas as referências bibliográficas, que são apresentadas de acordo com a norma da ABNT (NBR 6023, 2002).

CAPÍTULO II – OBJETIVOS

II.1- OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de métodos para a determinação de nitrito, nitrato e N-nitrosaminas em produtos cárneos.

Os objetivos específicos compreenderam:

- Desenvolver e validar um método de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para determinação de nitrato e nitrito, utilizando reagentes não carcinogênicos e de fácil descarte;
- Desenvolver método empregando a cromatografia gasosa com detetor de quimiluminescência (GC-TEA) e cromatografia gasosa acoplada a um detetor de massas (GC-MS) para a determinação de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR;
- Avaliar diferentes preparos de amostra (extração em fase sólida e microextração em fase sólida) para a determinação de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR em lingüiças por cromatografia gasosa, e validar o método.

CAPÍTULO III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1- CARACTERÍSTICAS GERAIS DE NITRATO, NITRITO E NITROSAMINAS

III.1.1- NITRATO E NITRITO

O íon nitrato (NO_3^-) é a base conjugada do ácido nítrico (HNO_3), ácido forte ($\text{pK}_a = -1,37$) que se dissocia em água formando íons nitrato. Sais de nitratos são solúveis em água, exceto os sais básicos de mercúrio e de bismuto (OGA, 1996).

O íon nitrito (NO_2^-), por sua vez é a base conjugada do ácido nitroso (HNO_2), ácido fraco de pK_a 3,37. Os sais de nitrito são mais estáveis que o ácido nitroso e são extremamente hidrossolúveis, exceto nitrito de prata (OGA, 1996).

Na natureza, os íons nitrato e nitrito são formados através de um processo de oxidação biológica (nitrificação), a partir do íon amônio, de acordo com as reações (III.1) e (III.2):



Estas reações são mediadas por microorganismos do solo como as nitrosomonas, que oxidam o íon amônio a nitrito, realizando a primeira etapa da reação (III.1), e as nitrobactérias, que oxidam o nitrito a nitrato (III.2), tornando este último mais abundante no ambiente (PURVES *et al.*, 2001).

Nitratos e nitritos estão, assim, presentes no solo, na água e nos vegetais e, portanto, distribuídos naturalmente em alimentos de origem vegetal e animal.

III.1.2- N-NITROSAMINAS

As nitrosaminas são compostos N-nitrosos, de fórmula estrutural $R_1R_2N=O$, onde R_1 e R_2 podem ser grupos alquila ou arila. Dependendo do radical R_1 e R_2 , esses compostos podem se encontrar nas formas sólida, líquida ou gasosa. De modo geral, as N-nitrosaminas são estáveis, decompondo-se apenas lentamente em soluções ácidas ou por radiação ultravioleta (MAFF, 1992).

Os compostos N-nitrosos são produzidos através da reação química entre compostos orgânicos nitrogenados e um agente nitrosante.

Em laboratório, as N-nitrosaminas são, em geral, sintetizadas a partir do ácido nitroso e aminas secundárias. Os aspectos químicos dessa reação têm sido intensivamente estudados e vários artigos de revisão encontram-se publicados na literatura (KLEIN, 1982; LOEPPKY e MICHEJDA, 1994; ZWICKENPFLUG, 2000).

As espécies nitrosantes mais importantes são N_2O_3 , NO_2/N_2O_4 , H_2ONO^+ e NO . O ácido nitroso ($HONO$) e o íon nitrito (NO_2^-), apesar de serem inativos, podem formar espécies nitrosantes ativas através de diversos equilíbrios químicos (Figura III.1) (DOUGLASS *et al.*, 1978).

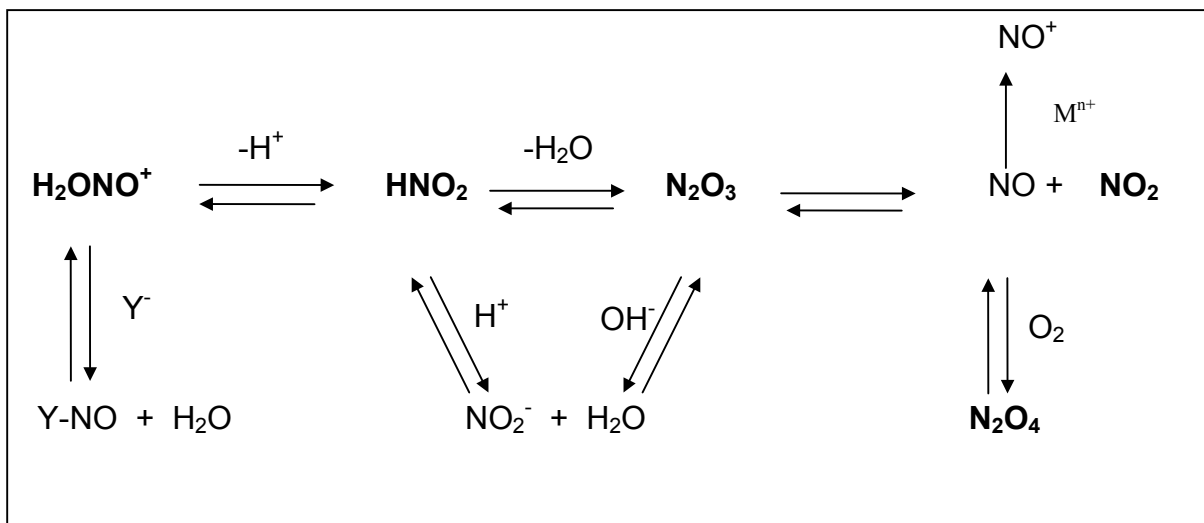
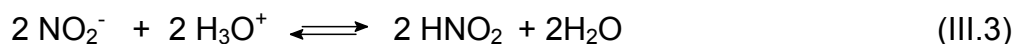
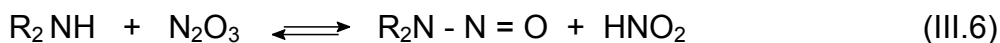


Figura III.1 - Equilíbrios químicos envolvidos na formação de espécies nitrosantes. (DOUGLASS *et al.*, 1978).

O agente nitrosante mais importante que participa na formação de N-nitrosaminas em sistemas alimentícios é o anidrido nitroso (N_2O_3), produzido a partir de 2 moles de HNO_2 ou NO_2^- em solução aquosa ácida (FRIDMAN *et al.*, 1971).



O anidrido nitroso, uma vez formado, reage com a amina secundária através do par de elétrons não compartilhados do nitrogênio, para formar a N-nitrosamina correspondente. Em solução aquosa, essa reação segue uma cinética de segunda ordem em termos de nitrito e de primeira ordem em relação a amina (FRIDMAN *et al.*, 1971).



Uma vez que é a amina não protonada que participa na formação de nitrosaminas, tanto o pH como o pKa da amina influenciam a reação de nitrosação. Em geral, o pH ótimo de reação situa-se entre 2,5 e 3,5, o que se deve ao efeito inverso entre a formação do anidrido nitroso, favorecido em pH ácido, e da amina livre, favorecido em pH básico (WALTERS *et al.*, 1984). Por outro lado, a velocidade de formação de N-nitrosaminas é inversamente proporcional à basicidade da amina; exemplo disto é que, no mesmo valor de pH, a piperazina (pKa 5,57) forma o composto N-nitroso a uma velocidade 5×10^4 vezes maior do que a dimetilamina de pKa 10,72 (FAN e TANNENBAUM, 1972; DOUGLASS *et al.*, 1978).

Ressalta-se que o nitrato pode ser reduzido a nitrito na cavidade bucal e, sendo a faixa ótima de pH para a formação de nitrosaminas semelhante àquela encontrada no estômago do homem após ingestão de alimentos, torna a formação de nitrosaminas *in vivo* um assunto de extrema importância (CRADDOCK, 1992; MIRVISH *et al.*, 1995).

SEN *et al.*, (2000) estudaram a formação da nitrosometiluréia (NMU) por nitrosação da creatinina em carnes curadas no pH gástrico e encontraram níveis de NMU acima do limite permitido.

Outro aspecto importante na formação de N-nitrosaminas é a presença de catalisadores e/ou inibidores da reação de nitrosação. Dentre as substâncias destacam-se como catalisadores: tiocianato, formaldeído, ácidos e haletos e como inibidores: ascorbato, α -tocoferol e SO_2 / bissulfito (FAN e TANNENBAUM, 1973).

Nos alimentos podem existir substâncias inibidoras da reação de formação de nitrosaminas, tais como: taninos, compostos fenólicos e vitaminas C, E e A. Particularmente, o ácido ascórbico e o α -tocoferol são, provavelmente, os inibidores mais importantes, uma vez que se encontram naturalmente presentes em alguns alimentos (SCANLAN, 1983; POTTER, 1996).

Segundo estudos realizados *in vitro*, o mecanismo de inibição envolve a redução do anidrido nitroso a óxido nítrico tanto pelo ácido ascórbico (AA) como

α -tocoferol (TF). Os inibidores são oxidados a ácido deidroascórbico (DHA) e α -tocoquinona (TQ) (Figura III.2) (SMITH, 1980).

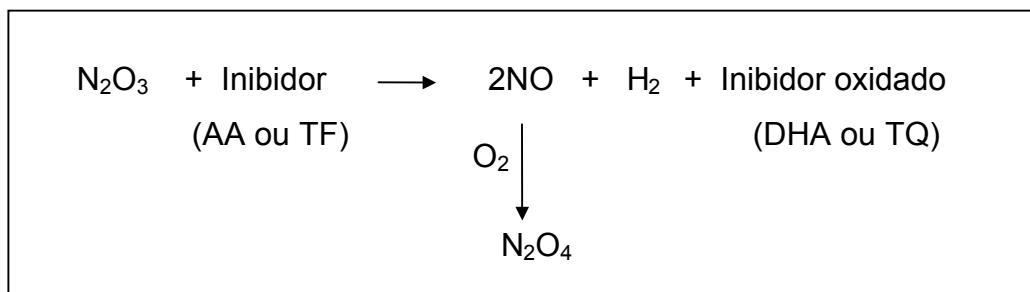


Figura III.2 - Reação de inibição da reação de nitrosação.

A ação inibidora do ácido ascórbico sobre a reação de nitrosação de uma amina foi descoberta acidentalmente na formulação do analgésico aminopirina, quando foi inibida a formação de nitrosodimetilamina. Posteriormente, foi observado que esta vitamina inibia fortemente a formação de compostos N-nitrosos a partir da maioria das aminas e amidas (MIRVISH, 1972). Em consequência, a administração conjunta de ácido ascórbico ou carotenóides e aminas ou amidas em animais inibe os efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos e teratogênicos provenientes da síntese endógena de nitrosaminas ou nitrosamidas (WALTERS, 1992; ATANASOVA-GORANOVA, 1997).

RYWOTYCKI em 2002 estudou a influência de alguns aditivos funcionais na formação de nitrosaminas em carnes e produtos cárneos e chegou a conclusão que a adição de polifosfatos juntamente com nitrito de sódio aumenta o nível de nitrosaminas (NDMA e NDEA) e que este nível pode ser minimizado com a introdução de ascorbato nas salmouras.

Estudos realizados para avaliar o efeito do ascorbato e isoascorbato na formação de nitrosodimetilamina (NDMA) em salsichas e empregando níveis de nitrito legalmente permitidos nos EUA (156 mg kg^{-1}), evidenciaram que não há formação de quantidades significativas de NDMA. Entretanto, com o emprego de uma quantidade de nitrito 10 vezes superior, as salsichas apresentaram níveis de

10 a 20 mg kg⁻¹ de NDMA. Os resultados demonstram que o ascorbato e isoascorbato na faixa de 550 mg kg⁻¹, em ambos os níveis, reduzem, porém não evitam, a formação de NDMA em salsichas (FIDDLER *et al.*, 1973). Resultados semelhantes a respeito da capacidade das vitaminas A, C e E na faixa de e de polifenóis na faixa de de inibirem a reação de nitrosação foram descritos em outros trabalhos (PENSABENE e FIDDLER, 1985; HELSER *et al.*, 1992; POTTER, 1996; CHOI, *et al.*, 2002; POURAZRANG, *et al.*, 2002).

Outra forma de inibir a formação de nitrosaminas em carnes curadas foi avaliada por AHN *et al.*, 2003 que utilizaram a radiação gama. Os autores relatam resultados satisfatórios quanto a diminuição de NDMA e NPIR com a irradiação de 5 kGy em anchovas salgadas e fermentadas.

III.2- OCORRÊNCIA DE NITRATO, NITRITO E NITROSAMINAS EM ALIMENTOS

III.2.1- NITRATO E NITRITO

Os nitratos estão amplamente distribuídos no solo, água e vegetais. Sua presença no solo é imprescindível para que as plantas possam efetuar a síntese de suas proteínas celulares. Nitrato e nitrito são também utilizados como aditivos na forma de seus sais de sódio ou potássio em produtos cárneos e em queijos.

A presença de nitrato nas águas ocorre devido a sua elevada hidrosolubilidade, que aumenta consideravelmente sua concentração nas águas subterrâneas, rios e poços.

A maioria dos compostos nitrogenados em águas naturais tende a conversão para nitrato; então todas as fontes de nitrogênio, particularmente

nitrogênio orgânico e amônia, devem ser consideradas como fontes potenciais de nitrato. As fontes primárias de nitratos orgânicos incluem esgotos domésticos e rurais; para os nitratos inorgânicos que podem contaminar a água potável, destacam-se o nitrato de potássio e o nitrato de amônio, ambos largamente usados como fertilizantes. Os nitratos ocorrem naturalmente na água, em baixas concentrações, como produtos de estabilização aeróbia de matéria orgânica nitrogenada. Concentrações mais elevadas ocorrem por estabilização de esgotos, drenagem de áreas fertilizadas ou, ainda, oxidação de amônia de origem industrial (BRANCO e ROCHA, 1977). O nível de nitrato pode variar amplamente, chegando até a 450 mg L^{-1} em regiões agrícolas onde são utilizados fertilizantes nitrogenados (CORNÉE *et al.*, 1992).

O nitrito é encontrado no meio ambiente somente a nível de traços. Ele pode ser encontrado tanto naturalmente, como pela sua utilização como aditivo alimentar, principalmente como conservante e agente antimicrobiano em queijos e produtos cárneos (MOORE e MOORE, 1976).

Nos vegetais, o nitrato se encontra naturalmente presente, visto que a planta absorve nitrato como fonte de nitrogênio para seu crescimento (WALKER, 1975). Em vegetais danificados ou em condições de armazenamento inadequadas, incluindo temperatura elevada e período prolongado, há uma tendência de redução do teor de nitrato, enquanto o teor de nitrito aumenta. A conversão de nitrato a nitrito pode ser decorrente da ação da nitrato-redutase endógena ou da presença exógena de bactérias redutoras. A refrigeração é capaz de retardar o processo, sem contudo, preveni-lo (OLMEDO e BOSCH, 1988).

Durante o processo de cozimento do alimento também pode ocorrer diminuição do teor de nitrato, visto que o íon tende a se difundir para a água de imersão (OLMEDO e BOSCH, 1988).

Já o teor de nitrito em vegetais crus, diferentemente do teor de nitrato, é baixo, geralmente menor que 2 mg kg^{-1} do produto, enquanto os vegetais fermentados ou em conservas, podem conter elevados teores de nitrato, acima de

3500 mg kg⁻¹ e consideráveis níveis de nitrito, cerca de 400 mg kg⁻¹ (HOTCHKISS *et al.*, 1992).

Em alimentos industrializados, os sais de nitrato e nitrito são adicionados no processo de cura de carnes juntamente com a adição de sal, açúcar, temperos e outros ingredientes, objetivando a preservação do produto, desenvolvimento e fixação de cor, sabor, aromas e melhoria de rendimento (JUDGE *et al.*, 1989). Já em queijos, esses sais evitam o chamado estufamento tardio, defeito que aparece depois de duas ou três semanas após a fabricação do alimento, que é causado, na grande maioria, pelo *Clostridium tyrobutyricum*, cuja presença produz alteração no odor e sabor do alimento (KYRIAKIDIS *et al.*, 1997).

O nitrito, adicionado na forma de sais de potássio ou sódio, é utilizado para preservar o aroma, inibir o crescimento de microrganismos e, principalmente, conferir e fixar a cor rósea avermelhada, característica dos produtos curados. A cor de um produto cárneo está associada à conformação química e concentração dos pigmentos heme, mais especificamente da mioglobina, composta por uma cadeia polipeptídica denominada globina, acoplada a um grupo prostético, denominado heme, composto por um átomo de ferro e um anel porfirínico (CLYDESDALE e FRANCIS, 1976).

Na Figura III.3 é apresentado um conjunto de reações redox envolvendo o íon nitrito, cujo mecanismo é indispensável para a compreensão da formação e estabilidade da cor dos produtos curados (SEBRANECK e FOX, 1985).

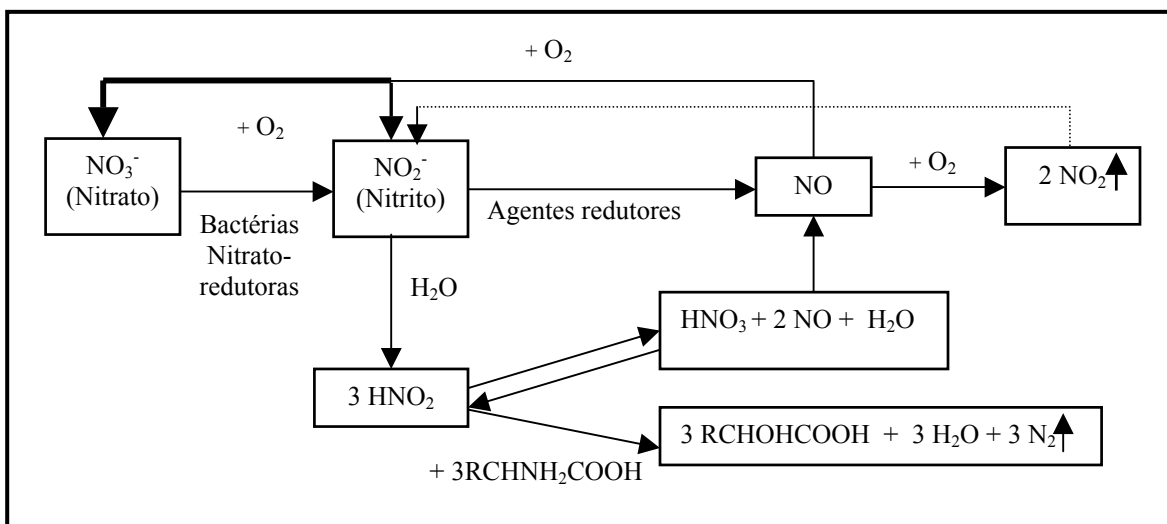


Figura III.3 - Reações redox envolvendo o nitrato (PRICE e SCHWEIGERT, 1994).

O nitrito pode ser adicionado diretamente no alimento ou ser obtido através da redução do nitrato, promovida pela ação de bactérias redutoras. A adição de nitrato é atualmente empregada somente em processos de cura longa (JUDGE *et al.*, 1989).

O óxido nítrico é obtido da redução do nitrito que pode ocorrer de três formas distintas, a saber: ação de agentes redutores; ação redutora dos tecidos e decomposição de ácido nítrico (FOX e ACKERMAN, 1968; SEBRANECK e FOX, 1985).

Agentes redutores, como sais de ácido ascórbico, doam elétrons ao nitrito, levando à formação de óxido nítrico (BAUERNFEIND e PINKERT, 1970; JUDGE *et al.*, 1989; IZUMI *et al.*, 1989). Esta, se constitui na principal via de obtenção de óxido nítrico nos processos de curas comerciais (CORNFORTH, 1994).

III.2.2- N-NITROSAMINAS

Compostos nitrosos, como por exemplo N-nitrosaminas, N-nitrosouréias, N-nitrosoguanidinas e N-nitrosoaminoácidos podem ser produzidos durante o processamento de alimentos. Dentre os compostos N-nitrosos, as nitrosaminas constituem o grupo mais numeroso e mais estudado de substâncias, sendo grande o número de revisões a respeito dos níveis de N-nitrosaminas voláteis presentes em carnes curadas, peixes, queijos, leite em pó, malte, cerveja, plantas medicinais e alimentos destinados à população infantil (SANTAMARIA, 1997; GLÓRIA *et al.*, 1997; O'KEEFFE e KENNEDI, 1998; ATAWODI, 2003).

As N-nitrosaminas podem ser formadas no alimento a partir de precursores nitrosáveis do próprio alimento e de agentes nitrosantes. Entre os precursores nitrosáveis, destacam-se as aminas naturalmente presentes, principalmente em alimentos que possuem alto teor de proteínas (DOUGLASS, *et al.*, 1978; FIGUEREDO, 1981).

De modo geral, os alimentos crus de diferentes categorias tais como vegetais, carnes, peixes, frutas, cereais e produtos lácteos contêm baixos teores de N-nitrosaminas, muitas vezes próximos ao limite de detecção da metodologia analítica empregada (IKKEN, *et al.*, 1998). No entanto, o processo de cura, onde se adiciona nitrito e/ou nitrato, pode elevar consideravelmente o nível de nitrosaminas (GRAY e RANDALL, 1979; IFT, 1987; CASSENS, 1997).

Estudos têm sido realizados para estimar a ingestão diária de nitrato e nitrito pelas diversas fontes, e os resultados têm sido acima dos limites de ingestão diária aceitável (PENNINGTON, 1998). A concentração residual de nitrito controla a formação de N-nitrosaminas em alimentos, visto que a velocidade de formação de N-nitrosaminas é diretamente proporcional ao quadrado da concentração de nitrito (HILL, 1988). Verificou-se que ocorre um incremento na velocidade de formação de N-nitrosopirrolidina (NPIR) em "bacon" a medida que

se aumenta o teor de nitrito no produto em questão (GRAY *et al.*, 1982).

O mecanismo de formação da nitrosopirrolidina depende da temperatura de cozimento. Quando são utilizadas temperaturas baixas para a fritura, no intervalo de 100 a 150 °C, ocorre a formação de nitrosopirrolidina via pirrolidina e nitrosoprolina. No entanto, para temperaturas entre 175 a 200 °C ocorre preferencialmente a descarboxilação da prolina seguida pela nitrosação da pirrolidina. Esses resultados são importantes para estabelecer parâmetros no sentido de evitar e/ou minimizar a formação da N-nitrosamina (NAKAMURA *et al.*, 1976).

III.3- DADOS DE EXPOSIÇÃO DE NITRATO, NITRITO E NITROSAMINAS

III.3.1- NITRATO E NITRITO

A exposição diária da população em geral ao nitrato e nitrito é influenciada tanto pelos hábitos culturais como pelo estilo de vida e localização geográfica. A dieta ocidental é rica em peixes salgados e queijos que contribuem com valores relativamente altos de nitrito (WALKER, 1990). Já os vegetarianos consomem, de 50% a 100% mais vegetais do que outros consumidores, conseqüentemente ingerindo alto teor de nitrato (STOPES *et al.*, 1988).

Os alimentos de origem vegetal são a principal fonte da ingestão de nitrato pelo homem, representando aproximadamente 80% do total de nitrato ingerido (KNIGHT *et al.*, 1987).

Pesquisas frequentemente devem ser efetuadas para avaliar a quantidade de nitratos e nitritos em alimentos a fim de que a Ingestão Diária Aceitável (IDA) relativa a esses íons não seja ultrapassada, colocando em risco a saúde da população.

O Comitê FAO/WHO, do inglês Food and Agriculture Organization/World Health Organization de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA), em sua 59^a Reunião, reavaliou os limites de IDA para os íons nitrito e nitrato, com base nos últimos estudos toxicológicos existentes. A IDA é a quantidade de um aditivo (no caso nitrato e nitrito) que pode ser ingerido por toda a vida sem provocar um dano à saúde humana.

Para o nitrito o JECFA estabeleceu uma IDA de 0-0,07 mg kg⁻¹ de peso corpóreo, expresso como íon nitrito (WHO, 2003). Para o nitrato, o Comitê manteve a IDA de 0-3,7 mg kg⁻¹ de peso corpóreo, expresso como íon nitrato, a qual tinha sido estabelecida na sua 44^a reunião (WHO, 1996).

SILVEIRA *et al.*, 1991 analisaram 112 amostras de queijos curados adquiridos na cidade de São Paulo. Destas, 81 não apresentaram nitratos nem nitritos; 8 apresentaram nitratos, das quais uma estava acima do limite permitido pela legislação, e nas 23 restantes, os níveis de nitrito e nitrato estavam abaixo de 10 mg kg⁻¹.

Os teores de nitrato e de nitrito encontrados em alguns tipos de alimentos estão apresentados na Tabela III.1.

Tabela III.1 - Teores mínimo e máximo de nitrato e nitrito em alimentos.

Alimento	Nitrato (mg kg⁻¹)	Nitrito (mg kg⁻¹)	Referências
Rúcula	571-6122	-	MARTIN e RESTANI, 2003
Rabanete	766-4570	-	CHUNG <i>et al.</i> , 2003
Espinafre	195-7793	-	CHUNG <i>et al.</i> , 2003
Queijos	7,40-13,10	0,70-1,50	KYRIAKIDIS <i>et al.</i> , 1997
Lingüiça defumada	12,36-104,44	1,97-43,57	TURRA e AYUB, 1999
Lingüiça bovina	3,2-3,8	7,4-7,8	KAZEMZADEH e ENSAFI, 2001
Salame	2,0-2,8	4,3-4,9	KAZEMZADEH e ENSAFI, 2001
Salsicha	-	7,92-38,20	MOUSAVI <i>et al.</i> , 1998
Salsicha	14-489	23-52	SANTAMARIA, 1997
Carne	508-984	38-76	VELASCO-ARJONA <i>et al.</i> , 1998

III.3.2- N-NITROSAMINAS

São encontrados na literatura dados a respeito da exposição à N-nitrosaminas em alguns países como Suécia, Alemanha, França e outros. No entanto, em geral, pode-se afirmar que os dados disponíveis são escassos e/ou incompletos, sendo que para o Brasil praticamente não existem dados disponíveis a respeito da exposição às N-nitrosaminas através dos alimentos (CORNÉE *et al.*, 1992; BIAUDET *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 1995; MITACEK *et al.*, 1999; LEVALLOIS *et al.*, 2000).

O número de trabalhos publicados a respeito do teor de N-nitrosaminas em produtos cárneos têm sido crescente, sendo que a maioria deles relaciona-se com o teor de nitrosopirrolidina (NPIR) e nitrosoidroxipirrolidina (NHPIR) em bacon (GOUGH *et al.*, 1976; REYES e SCANLAN, 1984; GLÓRIA *et al.*, 1997; RYWOTYCKI, 2003).

Na Tabela III.2 estão apresentados o teor de N-nitrosaminas encontrados em alguns alimentos.

Tabela III.2 – Teores mínimo e máximo de nitrosaminas em alimentos ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

ALIMENTO	NITROSAMINAS	CONTEÚDO	REFERÊNCIA
Queijo Gruyere	NDMA e NDEA	0,04-0,38	GLÓRIA <i>et al.</i> , 1997
Peixe salgado	NDMA	3-300	MAKI <i>et al.</i> , 1980
Lula assada	NDMA	2,4-13	KAWABATA <i>et al.</i> , 1980
Anchova fermentada	NDMA e NPIR	0,099-1,794	AHN <i>et al.</i> , 2003
Carne curada	NDMA, NDEA, NPIR e NPIP	ND – 55,0	HOTCHKISS e CASSENS, 1988
Carne curada	NDMA, NDEA, NMOR, NTHZ, NPRO e NPIP	1,0 – 25,0	REYES e SCANLAN, 1984
Presunto	NDBzA	23,6-52,3	SEN <i>et al.</i> 1997
Salsicha	NDMA, NDEA e NPIP	0,4-1,1	RAOUL <i>et al.</i> , 1997
Plantas medicinais	NDMA	1,2-3,4	ATAWODI, 2003
Picles	NDMA e NDEA	0,69-2,16	TRICKER e PREUSSMANN, 1988
Margarina	NMOR	1,7-3,80	SEN e SEAMAN, 1984
Sopas de vegetais	NDMA e NDEA	4,90-11,44	TRICKER e PREUSSMANN, 1991

NDMA: Nitrosodimetilamina, NDEA: Nitrosodietilamina, NPIP: Nitrosopiperidina, NPIR: Nitrosopirrolidina, NMOR: Nitrosomorfina, NTHZ: Nitrosotiazolidina, NPRO: Nitrosoprolina, NDBzA: Nitrosodibenzilamina

III.4- ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

III.4.1- NITRATO E NITRITO

Os maiores riscos toxicológicos decorrentes da ingestão de nitratos e nitritos são: ocorrência de metaemoglobinemia e a formação de compostos N-nitrosos (WALTERS, 1992).

Segundo CORTAS e WAKID (1991), em adultos sadios, os nitratos e nitritos são absorvidos pelo trato gastrointestinal, sendo o nitrato rapidamente excretado pela via renal. Os nitritos, por sua vez, combinam-se com a hemoglobina, transformando-a em metaemoglobina, por processo de oxidação do íon ferroso a íon férrico no complexo porfirínico. A metaemoglobina (Methb) é incapaz de transportar oxigênio, mas a enzima NADH-metaemoglobina-reductase (NADH-diaforase) presente nos eritrócitos converte-a novamente em hemoglobina.

Quando os níveis de exposição ao nitrito são baixos, a formação de Methb é reversível, sendo catalisada pela enzima NADH Methb-reductase. Quando o nível de exposição é elevado, o sistema de redução é saturado, resultando em um aumento da concentração de Methb no sangue. Níveis de Methb de 10% podem produzir cianose assintomática e com níveis entre 20 e 30% há o aparecimento de cianose com sinais de hipoxia, astenia, dispnéia, cefaléia, taquicardia e inconsciência. Concentrações em níveis superiores a 50% podem ser fatais (BORONAT *et al.*, 1982).

A Figura III.4 apresenta a reação de formação da metaemoglobina pelo nitrito e a reação de conversão para hemoglobina. Há vários fatores que mantêm fisiologicamente o íon ferro da hemoglobina no estado ferroso. O mais importante parece ser a enzima NADH-metaemoglobina-reductase (SWANN, 1975).

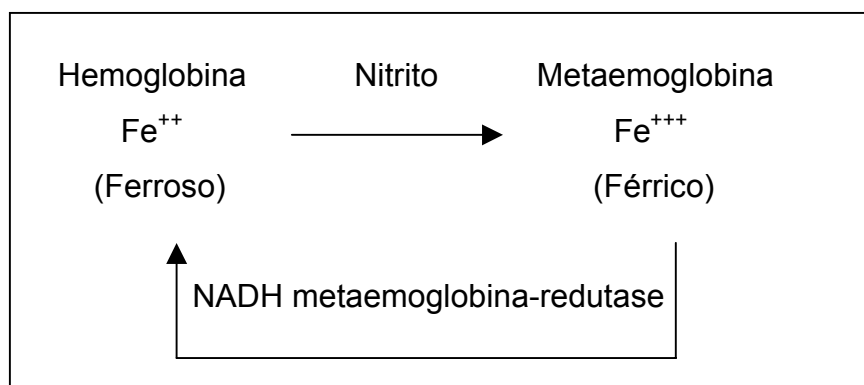


Figura III. 4 - Formação de metaemoglobina pelo nitrito e sua conversão a hemoglobina (SWANN, 1975).

A população infantil, em particular os lactentes com idade inferior a três meses são os mais susceptíveis a metaemoglobinemia por vários fatores: (1) possuem baixa acidez gástrica, favorecendo a redução do nitrato a nitrito; (2) levando em consideração o peso, a quantidade relativa de água ingerida pelos lactentes é, aproximadamente, dez vezes superior a dos adultos e (3) a hemoglobina fetal consiste de 60 a 80% da hemoglobina total do sangue dos recém nascidos. Cabe destacar que a hemoglobina fetal é reduzida mais facilmente do que a hemoglobina de um indivíduo adulto e em lactentes há uma imaturidade do sistema NADH-metaemoglobina redutase, que tende a desaparecer a partir dos 4 meses de idade (WHO, 1978; JAFFÉ, 1981; McKNIGHT *et al.*, 1999).

Na Alemanha e na África do Sul, a concentração máxima permitida para o íon nitrato em água potável é de 4,4 mg L⁻¹ e a Comunidade Européia estabelece um limite de 5,6 mg L⁻¹. Estudos em crianças da Europa têm demonstrado que de três a quatro por cento da causa da metaemoglobinemia ocorrem com doses menores de 10 mg L⁻¹ (BRUNING-FANN e KANEENE, 1993).

Embora a metaemoglobinemia seja a princípio o mais ameaçador efeito da exposição a nitrato, vários estudos sobre a alta exposição de nitrato têm sido

ligados a uma variedade de efeitos como hipertrofia, aumento da tireóide, hipertensão e até efeitos carcinogênicos devido a formação de compostos N-nitrosos. Todos os efeitos têm sido observados em estudos epidemiológicos em seres humanos e são, freqüentemente, sustentados por estudos de fisiologia humana e animal (BRUNING-FANN e KANEENE, 1993).

Estudos epidemiológicos sugerem que a alta ingestão de agentes nitrosantes e a formação intragástrica de N-nitrosaminas podem estar associadas com um alto risco de câncer gástrico, hepático e de esôfago (SIDDIQI, *et al.*, 1992; WU *et al.*, 1993; STEFANI *et al.*, 2001; MITACEK *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2002). Por outro lado, evidência indireta indica, através de estudos epidemiológicos ou nutricionais, que dietas ricas em vegetais, embora importantes fontes de nitrato, são associadas com a diminuição do risco de câncer (WHO, 1996). Fatores protetores, tais como ácido ascórbico e α -tocoferol, presentes nestes alimentos são conhecidos como inibidores da formação de compostos N-nitrosos (MIRVISH, 1994; TERRY *et al.*, 2001).

Em 1984, estudos na Itália compararam a incidência do câncer gástrico em regiões com alto e baixo teor de nitrato em água potável. Os pesquisadores encontraram correlação positiva entre comunidades com elevado risco de câncer e alto teor de nitrato ($> 4,5 \text{ mg L}^{-1}$) em água potável. Em comunidades que ingeriram água potável com alto teor de nitrato, foi treze vezes maior a incidência de câncer estomacal, do que outras comunidades que ingeriram a água potável com baixo teor de nitrato. Na Inglaterra, estudos realizados em 1985 de 253 áreas urbanas, mostraram relação entre o nível de nitrato em água e a taxa de câncer no estômago (BRUNING-FANN e KANEENE, 1993).

III.4.2- N-NITROSAMINAS

Os compostos N-nitrosos e, em particular, as N-nitrosaminas, são considerados potentes carcinógenos, além de apresentarem ação teratogênica e mutagênica em animais de laboratório (BARTSCH e MONTESANO, 1984; REYES e SCANLAN, 1984 ; SCANLAN, 1983; ROCHE *et al.*, 1994). Efeitos carcinogênicos de N-nitrosaminas já foram observados em mais de 40 espécies de animais testados, inclusive no macaco (BARTSCH e MONTESANO, 1984).

A indução de tumores pode ocorrer em diferentes órgãos, dependendo da estrutura química do composto N-nitroso, da dose, da via de exposição e da espécie animal. Embora não existam evidências diretas da incidência de câncer em humanos como resultado da exposição a nitrosaminas, presume-se que o homem também seja sensível à ação tóxica desses compostos (PREUSSMANN e STEWART, 1984; ROCHE *et al.*, 1994).

As nitrosaminas são absorvidas principalmente no trato gastrointestinal e também através da pele, ainda que com menor rapidez e porcentagem mais baixa. Após a absorção, as nitrosaminas entram na corrente circulatória, desaparecendo do sangue após um período de 8 horas. Os compostos nitrosos não são bioacumulados, mas sofrem biotransformação no organismo (SWANN, 1975).

As nitrosaminas requerem ativação metabólica para exercerem sua ação carcinogênica (MAGEE e BARNES, 1956, 1967). A primeira etapa envolve uma hidroxilação do carbono α do grupo alquila, catalisada pela monooxigenase de função mista (Citocromo P₄₅₀), formando um aldeído ou cetona e uma nitrosamina primária, instável, a qual tautomeriza para um alquildiazoidróxido. Este azoidróxido pode dar origem a um íon diazônio (MIRVISH, 1975), que por sua vez pode alquilar sítios nucleofílicos do DNA, RNA e proteínas.

III.5. ASPECTOS DE LEGISLAÇÃO

III.5.1- NITRATO E NITRITO

O limite tolerado de nitrito e nitrato como aditivo alimentar depende, em particular, do produto alimentício e da legislação vigente de cada país.

A utilização de sais de nitrato e nitrito de sódio e/ou potássio no processo de cura de carnes, levaram o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, United State Department of Agriculture) a extensivas pesquisas por volta de 1920, regulamentando sua utilização já em 1925. A regulamentação permitia o uso de nitrato e/ou nitrito, com um nível residual máximo de 200 mg de nitrito kg^{-1} , calculado como nitrito de sódio no produto final. Em 1975, um grupo de peritos, criado pelo USDA, recomendou algumas alterações nos níveis de nitrato e nitrito que foram adotadas em 1978, quando a regulamentação para bacon foi alterada de maneira a permitir a adição de nitrito de sódio (120 mg kg^{-1}) ou nitrito de potássio (148 mg kg^{-1}), acompanhado da adição de ascorbato ou eritorbato de sódio (550 mg kg^{-1}) como inibidor de N-nitrosaminas. Ao mesmo tempo, o uso de nitrato em bacon foi proibido e exigido uma monitoração do nível de N-nitrosaminas no local de produção (IFT, 1987).

Em 1986, por orientação do USDA, a utilização de nitrato foi permitida somente em certos produtos fermentados ou de cura longa.

A adição de nitrato de sódio ou potássio em queijos, é permitida no Brasil no limite de 50 mg kg^{-1} no produto a ser consumido (BRASIL, 1996).

No Brasil, os limites do uso de aditivos são regulamentados pela Portaria nº 1.004 de 11 de dezembro de 1998 do Ministério da Saúde, sendo estabelecido para produtos cárneos, exceto o charque, limites de 150 mg kg^{-1} e 300 mg kg^{-1} para nitrito e nitrato, respectivamente (BRASIL, 1999).

Para o teor de nitrato e nitrito em água potável a Resolução nº 310, de 16 de junho de 1999, estabelece os limites de 50 mg L^{-1} , calculado como nitrato e $0,02 \text{ mg L}^{-1}$, calculado como nitrito (BRASIL, 2001).

Cabe ressaltar que o Brasil não dispõe de legislação para limites do teor de nitrato em vegetais, mas a Comunidade Européia estabeleceu como limite máximo permitido para alface produzida em casa de vegetação, teores de nitrato na massa de matéria fresca de 3500 mg kg^{-1} para o período de verão e 4500 mg kg^{-1} para o período de inverno. O limite máximo para alface produzida em campo aberto é de 2500 mg kg^{-1} . A concentração de nitrato em espinafre não deve exceder 3000 mg kg^{-1} no inverno e 2500 mg kg^{-1} no verão (MAFF, 1999).

III.5.2- N-NITROSAMINAS

São poucos os países nos quais existe regulamentação específica para N-nitrosaminas. Nos EUA, o FDA recomenda para os produtos cárneos curados, valores de no máximo $10 \text{ } \mu\text{g}$ de nitrosaminas voláteis totais por kg do produto e em cerveja se aceita um valor de no máximo $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de NDMA (HAVERY e FAZIO, 1985).

A Agência de Inspeção de Alimentos do Canadá estabelece níveis máximos de N-nitrosaminas como a NDMA, NDEA, NDPA, NDBA, NPIP e NMOR de 10 mg kg^{-1} e para NPYR de 15 mg kg^{-1} em carnes curadas (CANADA, 2003).

Nos países em desenvolvimento e, em particular, na América Latina, além de não existir um monitoramento de composto N-nitroso em alimentos, não existe uma legislação definida para esses.

III.6- ASPECTOS ANALÍTICOS NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO, NITRITO E NITROSAMINAS

III.6.1- NITRATO E NITRITO

São inúmeros os métodos analíticos desenvolvidos para a determinação e monitoramento de nitrato e/ou nitrito em alimentos, água, material biológico, plantas e solos.

O íon nitrato é considerado de baixa toxicidade, mas quando reduzido a nitrito pode representar um alto risco à saúde, portanto há interesse na determinação de ambos.

A quantificação de nitrato, através das diversas técnicas apresentadas na literatura, se diferenciam quanto à determinação que pode ocorrer de forma simultânea ou sequencial. Como exemplo de técnicas que realizam a determinação de nitrato e nitrito simultaneamente pode-se citar as técnicas voltamétricas e a eletroforese capilar, embora a detecção dos analitos seja independentemente um do outro em uma única medida (MOORCROFT *et al.*, 2001). A determinação sequencial se baseia na detecção do íon nitrito inicialmente, seguido da redução do íon nitrato ao íon nitrito para sua posterior quantificação. Os valores dos teores de nitrato são obtidos por diferença. A estratégia de análise na determinação de nitrato e nitrito é dependente da metodologia a ser usada.

Existem uma variedade de agentes redutores que foram avaliados quanto a eficiência na redução do nitrato à nitrito, entre eles redutores a base de zinco (KOUPPARIS *et al.*, 1982; SU *et al.*, 1998), cobre-hidrazina (HILTON e RIGG, 1983) e cádmio cuperizado (VAN STANDEN, 1982). Uma nova técnica para reduzir nitrato à nitrito por foto-indução foi avaliado por TAKEDA e FUJIWARA, 1993, que reportou o uso da radiação UV entre 200 e 300 nm, resultando na formação de nitrito e oxigênio. Esta técnica se mostrou atrativa uma

vez que não há utilização de substâncias tóxicas como o cádmio, porém, as vezes este agente redutor pode provocar uma redução incompleta do nitrato ou levar à formação de amônia.

III.6.1.1- PREPARO DA AMOSTRA NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO

A extração de nitrato e nitrito da matriz tem sido frequentemente realizada em meio aquoso devido a maioria dos sais de nitrato e nitrito serem solúveis em água. Segundo USHER e TELLING, 1975 a extração deve ser realizada em pH neutro, ou levemente alcalino, uma vez que o nitrito é instável em pH menor que 5. O método mais utilizado na extração de nitrato e nitrito para produtos cárneos é o recomendado pela AOAC, 1997, que envolve extração com água à 80 °C.

Dependendo da matriz (carne, leite, vegetal, entre outros), após a obtenção do extrato contendo nitrato e nitrito há necessidade de que este extrato passe por um processo de clarificação. O processo de clarificação do extrato contendo nitrato e/ou nitrito é fundamental uma vez que, para alguns métodos analíticos, como a espectrofotometria, são necessários extratos límpidos. Para tanto vários reagentes já foram avaliados como sulfato de alumínio e potássio (FOLLET e RATCLIFF, 1963), cloreto de cádmio + cloreto de bário (LARA *et al*, 1980), acetato de zinco + hexacianoferrato de potássio em meio básico e creme de alumina (ELLIOTT e PORTER, 1971). Pelos dados apresentados na literatura, o acetato de zinco + hexacianoferrato de potássio (Reagente de Carrez) tem sido o mais utilizado (ENSAFI e KAZEMZADEH, 1999; VELASCO-ARJONA, *et al.*, 1998; KAZEMZADEH e ENSAFI, 2001; HAGHIGHI e TAVASSOLI, 2002).

III.6.1.2- DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO

A técnica analítica mais amplamente empregada na determinação de nitrato e nitrito, por sua simplicidade, é a espectrofotometria. Porém, várias outras técnicas tem sido empregadas na determinação destes íons em diversas matrizes (Tabela III.3).

Tabela III.3 - Técnicas analíticas empregadas na determinação de nitrato e nitrito.

Técnica	Espécie	Referência
Espectrofotometria	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	ZATAR <i>et al.</i> , 1999; OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1995
Quimiluminescência/FIA	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	MIKUSKA e VECERA, 2003
Espectrofotometria/FIA	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	AHMED, <i>et al.</i> , 1996; ZHI-QI <i>et al.</i> , 1998; PINHO <i>et al.</i> , 1998; GABRIEL <i>et al.</i> , 1998; MONSER <i>et al.</i> , 2002; KAZEMZADEH e ENSAFI, 2001; HAGHIGHI e TAVASSOLI, 2002; YUE <i>et al.</i> , 2004
HPLC-UV	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	MERINO <i>et al.</i> , 2000; BUTT <i>et al.</i> , 2001; CONNOLLY PAULL, 2001.
HPLC-Quimiluminescência	NO_2^-	SEN <i>et al.</i> , 1994; DUNHAM <i>et al.</i> , 1995; HE <i>et al.</i> , 2000
HPLC-Fluorescência	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	STALIKAS <i>et al.</i> , 2003
HPLC-detecção condutimétrica	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	NOZAL <i>et al.</i> , 2000
HPLC-detecção eletroquímica	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	DI MATTEO e ESPOSITO, 1997; DAVIS <i>et al.</i> , 2000.

Potenciometria	NO_3^-	PÉREZ-OLMOS <i>et al.</i> , 2001; MOURZINA <i>et al.</i> , 2003
Polarografia	NO_3^-	ZHAO e CAI, 1988; XIMENES <i>et al.</i> , 2000
Eletroforese capilar	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	ÖZTEKIN <i>et al.</i> , 2002; MIYADO <i>et al.</i> , 2003
Fluorescência	NO_2^-	HUANG <i>et al.</i> , 2000; BULDT e KARST, 1999; WANG <i>et al.</i> , 2000
Espectroscopia de absorção atômica	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	SILVA <i>et al.</i> , 1986

FIA: análise por injeção em fluxo, HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência.

Atualmente, muitos sistemas utilizados na determinação de nitrato e nitrito foram mecanizados dando origem aos sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês flow injection analysis).

A mecanização e/ou automação de procedimentos visando a determinação quantitativa de espécies químicas, tem sido proposta como alternativa aos procedimentos convencionais quando se pretende:

- Analisar um grande número de amostras por unidade de tempo;
- Minimizar o consumo de amostras e de reagentes;
- Diminuir problemas de contaminação;
- Melhorar a precisão dos resultados analíticos.

Muitas técnicas de detecção podem ser acopladas a estes sistemas como detetores eletroquímicos (SEN *et al.*, 1994), espectrofotométricos (CHEN *et al.*, 1999; KAZEMZADEH e ENSAFI, 2001; HAGHIGHI e TAVASSOLI, 2002), entre outros.

O método recomendado pela AOAC para a determinação de nitrato e nitrito, baseia-se na reação do nitrito com uma amina primária aromática em meio ácido para formar um sal de diazônio, que por sua vez reage com um composto aromático formando um azo-composto (reação de Griess), que absorve na região

do visível do espectro eletromagnético. O íon nitrato é determinado, geralmente, como íon nitrito, após redução em coluna de cádmio esponjoso (ELLIOT e PORTER, 1971; AOAC, 1997). Esta reação foi avaliada por sistema de injeção em fluxo por FERREIRA *et al.*, 1996, apresentando-se como uma metodologia simples, rápida e precisa na determinação simultânea de nitrato e nitrito. O nitrato foi reduzido a nitrito por intermédio de uma mini coluna de cádmio cuperizado (3 mm de diâmetro interno).

Outras reações foram avaliadas em sistemas de injeção em fluxo acoplados a um espectrofotômetro na determinação de nitrato e nitrito em diversas matrizes, conforme apresentado na Tabela III.4. Em todos os trabalhos apresentados a frequência de amostragem foi na faixa de 20-30 determinações/hora.

Tabela III.4 - Métodos publicados para determinações de nitrato e nitrito.

Sistema Reacional^a	Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Matrizes	Referência
VNB – KBrO_3	NO_2^- (0,5) NO_3^- (2,5)	Água	ZHI-QI <i>et al.</i> , 1998
VPR – NaBrO_3	NO_2^- (1,0) NO_3^- (10,0)	Carnes e água	KAZEMZADEH e ENSAFI, 2001
GLC – NaBrO_3	NO_2^- (1,0) NO_3^- (2,0)	Carnes e água	ENSAFI e KAZEMZADEH, 1999
NA + NED	NO_2^- (1,0) NO_3^- (10,0)	Lingüiças, Queijos e farinha de trigo	AHMED <i>et al.</i> , 1996
SFA + HCl + KCl	NO_2^- (1,0)	Lingüiças	MOUSAVI <i>et al.</i> , 1998
CPMB	NO_2^- (2,0) NO_3^- (2,0)	Água, carne e vegetais	ZATAR <i>et al.</i> , 1999

^a VNB - Verde de naftol B, VPR - Vermelho de pirogallol, KBrO_3 - Bromato de potássio, NaBrO_3 - Bromato de sódio, GLC - Galocianina, NA - 3- Nitroanilina e NED - 1-Naftil etileno diamina, SFN - Safranina, HCl - Ácido clorídrico, KCl - Cloreto de potássio, CPMB - Complexo fosfomolibdico.

III.6.2- N-NITROSAMINAS

Para fins analíticos, as N-nitrosaminas são divididas em voláteis e não voláteis, sendo as últimas consideradas todo composto N-nitroso não destilável em um sistema aquoso. Tais compostos incluem dialquilnitrosaminas de cadeia longa, N-nitrosopeptídeos e N-nitrosoderivados de bases orgânicas. As diferenças nas

propriedades químicas, físicas e fisico-químicas desses compostos dificultam o estabelecimento de métodos analíticos de aplicação geral (WALTERS, 1992). Todavia, três metodologias analíticas têm sido basicamente adotadas (SCANLAN e REYES, 1985).

- Formação de derivados voláteis com subsequente análise por cromatografia gasosa (GC) com detetor de quimiluminescência (TEA, do inglês Thermal Energy Analyzer).
- Separação do composto N-nitroso não volátil por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detetor TEA.
- Determinação da quantidade total de compostos N-nitrosos mediante clivagem química da ligação N-NO e detecção do NO liberado por quimiluminescência.

III.6.2.1- PREPARO DE AMOSTRAS NA DETERMINAÇÃO DE N-NITROSAMINAS VOLÁTEIS

A etapa de preparo da amostra geralmente é necessária para isolar os componentes de interesse de uma matriz, para uma forma apropriada à aplicação do método de determinação escolhido (ANDERSON, 1991).

Em geral, as técnicas de preparo da amostra incluem procedimentos como extração, limpeza do extrato e pré-concentração, visando basicamente a eliminação dos interferentes e o ajuste da concentração do analito, acima do limite detectável (BUTZKE, 2000). Em particular, o preparo de amostras de alimentos, visando a determinação de um composto volátil, deve ser avaliada cuidadosamente, devido a complexidade da matriz, baixa concentração do composto de interesse (geralmente, em níveis de ng g^{-1}), facilidade de perda por volatilização, destruição do composto e formação de artefatos (BLANCH *et al.*, 1998).

Uma técnica ideal de preparo de amostra deve apresentar: facilidade no manuseio, rapidez, baixo custo, ser compatível com a faixa de instrumento de análise e apresentar boa eficiência analítica, incluindo seletividade e aplicabilidade para determinações simultâneas (PAWLISZYN, 1997).

Muitas técnicas automatizadas e hifenadas têm sido desenvolvidas com propósito de eliminar as dificuldades durante o preparo de amostras. A técnica tradicional como extração com solvente e outras mais recentes como a extração em fase sólida (SPE, do inglês Solid Phase Extraction), a microextração em fase sólida (SPME, do inglês Solid Phase Microextraction), a extração por fluido supercrítico (SFE, do inglês Supercritical Fluid Extraction) e extração por microondas têm sido utilizadas para o preparo de amostras visando o isolamento de nitrosaminas voláteis em alimentos.

III.6.2.1.1- EXTRAÇÃO COM SOLVENTE

A extração com solvente, seguida da pré-concentração sob fluxo de nitrogênio ou por evaporação em evaporador rotatório, foi um dos primeiros métodos utilizados para isolar compostos voláteis em alimentos. Porém, os baixos níveis de concentração dos compostos voláteis em alimentos, cerca de $\mu\text{g kg}^{-1}$, restringem a aplicação direta deste tipo de extração (SIDES *et al.*, 2000).

Para a extração de N-nitrosaminas voláteis em alimentos o método recomendado pela AOAC é baseado na destilação com solventes e posterior concentração em tubos de Kuderna-Danish (AOAC, 1997).

SEN *et al.*, (2000) desenvolveram um método para extração de N-nitrosometiluréia (NMU) em carnes curadas. O método foi baseado na extração da NMU com acetato de etila, remoção das gorduras com n-hexano e a limpeza do extrato por extração em fase sólida em cartucho octadecil. A NMU foi eluída da

fase com diclorometano (DCM). Os autores reportam uma recuperação da NMU na faixa de 42-68%.

ATAWODI, 2003 realizou a extração N-nitrosaminas voláteis em plantas medicinais por destilação com óleo mineral e limpeza do extrato em coluna Extrelut, com eluição com DCM e pré-concentração em tubos de Kuderna-Danish. A recuperação das nitrosaminas por este método variou de 80-90%.

MITCH *et al.*, (2003) compararam a extração da nitrosodimetilamina (NDMA) em águas por um extrator/concentrador líquido-líquido contínuo “Corning Accelerated One-StepTM” e por funil de separação. A extração realizada no extrator contínuo utilizando DCM como solvente extrator apresentou uma recuperação na faixa de $56\% \pm 11\%$, enquanto no funil de separação a extração foi de apenas $21\% \pm 10\%$.

As nitrosaminas voláteis são eficientemente extraídas dos alimentos por destilação a vácuo (MAVELLE *et al.*, 1991; RAOUL, 1997), porém este método apresenta algumas limitações como o elevado consumo de tempo, trabalho intensivo, pequena possibilidade de automação, possibilidade de contaminação, perda do analito durante o processo de concentração, formação de emulsões e problemas ambientais relacionados com o descarte de solventes devido ao elevado consumo.

Outras técnicas, tais como a extração em fase sólida, microextração em fase sólida e outras, têm sido utilizadas para o preparo de amostras na determinação de compostos voláteis em alimentos, em substituição a extração com solventes, portanto em trabalhos desenvolvidos recentemente essas técnicas têm sido mais utilizadas como parâmetro de comparação de técnicas recentes.

III.6.2.1.2 - EXTRAÇÃO EM FASE-SÓLIDA

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica usada tanto para extração de componentes de uma amostra como para limpeza e pré-concentração, e surgiu como uma alternativa para a extração líquido-líquido (ELL), apresentando algumas vantagens (HENNION, 1999).

A SPE é uma técnica interessante em relação à LLE por reduzir a quantidade de solvente, o custo, e o tempo de extração para a etapa de preparo da amostra. Os cartuchos de SPE podem ser mais seletivos do que a extração líquido-líquido, podendo eliminar outros problemas da LLE como formação de emulsões e variáveis de extração (HENNION, 1999).

O princípio desta técnica, em geral, pode ser dividida em 4 etapas (FRITZ e MACKA, 2000):

- Condicionamento: É realizado antes da extração do analito, preparando o cartucho para interações repetíveis com a amostra. O condicionamento é realizado pela passagem de um pequeno volume de solvente pelo cartucho capaz de ativar o sorvente, permitindo que os sítios ativos fiquem disponíveis e eluir algumas impurezas orgânicas presentes nesta fase.
- Aplicação da amostra: a amostra líquida é passada através do cartucho de SPE com auxílio de vácuo suave (aplicado em direção ao fim da coluna), que pode ser realizado com auxílio de uma bomba. Nesta etapa há retenção do analito e de constituintes indesejáveis presentes na amostra-matriz.
- Lavagem: É a passagem de um solvente através do cartucho SPE para remoção de constituintes indesejáveis retidos no cartucho.
- Eluição e coleta do analito: Passagem de um solvente apropriado, selecionado especialmente para quebrar a interação analito-sorvente, através do cartucho resultando na eluição seletiva do analito.

Apesar de encontrar na literatura citações que relatam a técnica de SPE dividida em quatro etapas, pode-se considerar a ativação do sorvente como uma etapa independente do condicionamento, a qual se enquadraria como uma quinta etapa.

Vários problemas surgiram quando a técnica de SPE foi aplicada no isolamento, limpeza e concentração de compostos voláteis em alimentos. Os problemas foram associados à sorção dos compostos voláteis nos cartuchos resultando em baixas recuperações e altos valores do branco. Muitas destas limitações foram superadas com a introdução no mercado de uma ampla faixa de fases estacionárias capazes de permitir uma seleção apropriada para cada grupo de compostos (SIDES *et al.*, 2000).

Um considerável número de solventes e muitas vezes uma mistura de dois ou mais podem ser usados na etapa de eluição (FRITZ e MACKA, 2000).

O uso da automação no preparo de amostras por SPE tem aumentado significativamente nos últimos anos, oferecendo algumas vantagens como economia de tempo, melhor precisão e exatidão nos resultados e segurança devido a exposição à amostras de risco (ROSSI e ZHANG, 2000).

O trabalho publicado por SANCHES FILHO *et al.*, 2003, é um exemplo do uso da técnica SPE na pré-concentração de nitrosaminas voláteis em amostras de salsichas. Neste trabalho a extração foi realizada por destilação à vácuo com posterior pré-concentração em carvão ativo, sendo que a recuperação variou de 38 a 55%. Segundo os autores, a recuperação foi baixa devido a dificuldade na extração das nitrosaminas da matriz sólida por destilação à vácuo. Em outro trabalho publicado em 2003, SANCHES FILHO *et al.*, avaliaram a extração de nitrosaminas em amostras aquosas utilizando o carvão ativo granular como fase sólida; neste trabalho os autores relatam que os resultados foram satisfatórios, a recuperação variou de 29 a 107%, podendo o método ser aplicado na extração de nitrosaminas voláteis em diversas matrizes aquosas.

AHN *et al.*, (2003) avaliaram a fase Extrelut® na extração de nitrosaminas em amostras de anchovas fermentadas e salgadas, onde a recuperação obtida foi de $92,7 \pm 5,98\%$.

Um inconveniente da técnica SPE advém da variação que pode ocorrer entre os cartuchos fabricados em indústrias diferentes, ou até mesmo entre cartuchos de uma mesma indústria e de um mesmo lote.

III.6.2.1.3 -MICROEXTRAÇÃO EM FASE-SÓLIDA

A microextração em fase-sólida desenvolvida por Arthur e Pawliszyn em 1990, é uma técnica relativamente nova de preparo de amostras, na qual se utiliza uma fibra de sílica fundida revestida por um filme fino de um polímero ou de um adsorvente sólido. O analito presente na amostra-matriz é diretamente extraído e concentrado na fibra (PAWLISZYN, 1997). Esta técnica envolve dois processos: a sorção (partição ou adsorção) dos analitos entre o revestimento e a amostra e a dessorção térmica do analito no injetor do cromatógrafo à gás (QUACH *et al.*, 1999).

A técnica de microextração em fase sólida pode ser realizada em dois modos:

- Microextração em fase-sólida com amostragem no espaço confinante (HS-SPME, do inglês Headspace Sampling- Solid Phase Microextracion): a amostra é frequentemente aquecida e os compostos voláteis são retidos na fibra sem que esta tenha contato direto com a amostra;
- Microextração em fase-sólida com amostragem por imersão direta (DI-SPME, do inglês Direct Imersion - Solid Phase Microextracion): a fibra é inserida diretamente na solução da amostra.

A eficiência de cada modo depende das propriedades dos analitos e da matriz. Particularmente, compostos não voláteis presentes nas amostras são concentrados e retidos na fibra, podendo reduzir a vida-útil da fibra e sua repetibilidade de extração (KATAOKA *et al.*, 2000). Em geral, a DI-SPME é mais sensível que a HS-SPME para analitos presentes em amostras líquidas. Porém, a HS-SPME apresenta baixo efeito de fundo e é apropriada para extrações de compostos voláteis em amostras sólidas, líquidas e gasosas (KATAOKA *et al.*, 2000).

A literatura apresenta uma lista de fibras comercialmente disponíveis e relaciona estas com o tipo de composto em que pode ser utilizada (KATAOKA *et al.*, 2000), porém estas devem ser conferidas experimentalmente.

Vários tipos de revestimento de fibras são encontrados para extrações de diferentes compostos. A afinidade da fibra pelo composto depende do princípio “semelhante dissolve semelhante”. Por exemplo, a fibra apolar polidimetilsiloxano (PDMS) é utilizada para extração de compostos apolares como muitos compostos voláteis, porém, ela pode ser aplicada com sucesso também para compostos polares, após otimização das condições de extração. Em geral, compostos voláteis requerem revestimentos mais densos dos polímeros (ALPENDURADA, 2000).

A SPME é uma técnica de grande aplicabilidade para uma extensa faixa de compostos em uma variedade de amostras (PAWLISZYN, 1997).

SEN *et al.*, (1997) avaliaram a técnica SPME na determinação de nitrosaminas voláteis em amostras de presunto. O método desenvolvido por estes autores foi baseado na extração por destilação à vapor e posterior pré-concentração por SPME utilizando-se uma fibra de poliacrilato. A recuperação por esta técnica variou de 41 a 112%.

A técnica de SPME apresenta numerosas vantagens em relação às técnicas de extração tradicionais. Comparando-a com a SPE, a SPME preserva todas as vantagens, tais como simplicidade, baixo custo e fácil automação além

de eliminar desvantagens como a baixa eficiência devido ao entupimento de cartuchos e o uso de solventes.

Uma outra grande vantagem da técnica de SPME é a facilidade de se obter sistemas hifenados, pois não requer o uso de interfaces especiais devido às amostras injetadas serem livres de solventes.

III.6.2.1.4 - EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

A extração com fluido supercrítico (SFE) é uma operação unitária que explora as propriedades dos solventes acima de seus pontos críticos para extrair ou separar componentes de uma mistura. A aplicação de SFE está baseada na observação experimental de que muitos gases aumentam seu poder de dissolução quando comprimidos acima do ponto crítico. Apesar desta observação ser bastante antiga, somente nos últimos anos este processo ganhou importância em processos analíticos e industriais (LANG e WAI, 2001).

O motivo que acarretou o desenvolvimento desta tecnologia como um processo viável de extração é que ela pode oferecer rapidez na extração, alta eficiência e facilidade no acoplamento com as técnicas de análise. Outro fator que contribuiu, foi a implantação de programas que visam a minimização do uso de solventes (MORALES *et al.*, 1998).

As propriedades dos fluidos supercríticos são intermediárias às aquelas exibidas por líquidos e gases: elevada densidade, baixa viscosidade, baixa tensão superficial, alto poder de solvatação e grande potencial de seletividade. As características (típicas do estado gasoso) permitem ao fluido supercrítico penetrar rapidamente no interior da amostra, possibilitando seu uso como solvente extrator (LANG e WAI, 2001).

Entre os gases, o dióxido de carbono apresenta várias propriedades vantajosas para a extração supercrítica, pois possui propriedade apolar com alta

volatilidade e não ocasiona problemas ambientais. Ele tem sido empregado, com certa vantagem, na separação de produtos naturais, alimentos, aromas e óleos, uma vez que não altera seus componentes. No aspecto de segurança ele não é tóxico, não é cancerígeno, não é inflamável e no aspecto econômico é barato e facilmente disponível (LARRÁYOZ *et al.*, 1999).

Num processo típico de extração supercrítica, o material contendo o produto de interesse é colocado no extrator e um fluxo de CO₂ é passado, extraíndo vários compostos. O poder de solvência do CO₂ é altamente dependente da pressão e da temperatura, que podem ser mudadas independentemente. A manipulação de um destes parâmetros permite aumentar a seletividade da técnica (LARRÁYOZ *et al.*, 1999).

Com o objetivo de alterar as propriedades físico-químicas, tais como densidade, poder de solvatação, polaridade e outros, podem ser adicionados ao fluido supercrítico, modificadores (solventes polares ou apolares), capazes de melhorar sua seletividade e solubilidade, aumentando o campo de aplicação da SFE, assim como os custos de operação (HAWTHORNE, 1993).

A extração com fluido supercrítico foi avaliada por FIDDLER e PENSABENE, 1996 na extração de nitrosaminas em bacon e comparada com a extração em fase sólida e extração por destilação à vácuo e destilação com óleo mineral. A recuperação média dos três métodos foram $74,9 \pm 7,5\%$; $80,3 \pm 6,0\%$ e $79,8 \pm 8,3\%$ para SFE, SPE e destilação, respectivamente.

Algumas vantagens podem ser verificadas na utilização da técnica de extração com fluido supercrítico quando comparada com técnicas tradicionais: possibilidade de fracionamento múltiplo, uso de solvente não tóxico, não inflamável, não explosivo e barato, o menor tempo de extração devido ao elevado coeficiente de transferência de massa e a facilidade de recuperação do solvente para a reciclagem. A SFE é aplicável às matrizes líquidas e sólidas e é sensível para compostos em nível de $\mu\text{g kg}^{-1}$.

III.6.2.2 - DETERMINAÇÃO DE NITROSAMINAS

Quanto a técnica de quantificação das N-nitrosaminas voláteis, a cromatografia gasosa (CG) tem sido a técnica mais utilizada e, geralmente, se encontra acoplada a detetores seletivos para nitrogênio. O detetor mais utilizado tem sido o de quimiluminescência (TEA, do inglês Thermal Energy Analyzer), uma vez que esse é seletivo para compostos que contêm o grupo N-nitroso (PENSABENE e FIDDLER, 1994; GLÓRIA *et al.*, 1997; RAOUL *et al.*, 1997). Porém, apesar do TEA ser seletivo para compostos N-nitrosos, também está sujeito a interferentes sendo, portanto, recomendado a confirmação de identidade por outra técnica analítica. Segundo IARC (International Agency for Research on Cancer) 1972, o principal método para a confirmação das N-nitrosaminas é a espectrometria de massas (MS, do inglês mass spectrometry).

Alguns trabalhos têm sido publicados a respeito de desenvolvimento de métodos para a determinação de N-nitrosaminas em alimentos. Um método para determinação de N-nitrosaminas voláteis em presunto defumado foi desenvolvido por SEN *et al.*, 1997, através da extração por destilação à vapor acoplado à microextração em fase sólida e detecção em GC-TEA. O limite de detecção do método foi de 1 a 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a NDBzA (Nitrosodibenzilamina) e NDBA (Nitrosodibutilamina), respectivamente. O nível de NDBzA encontrado em amostras de presunto defumado variou em média de 31,9 a 316 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

LUQUE-PÉREZ *et al.*, (2001) desenvolveram um método automatizado de injeção em fluxo baseado na hidrólise fotoquímica da N-nitrosodimetilamina com posterior reação do nitrito com o reagente de Griess. Este método foi avaliado quanto sua aplicabilidade na determinação de NDMA em amostras de carnes curadas através de teste de recuperação com resultados entre 91,6 -105,8 %. O método espectrofotométrico apresentou limite de detecção entre 0,78 e 15 ng mL^{-1} , que variou de acordo com o tempo de irradiação.

CÁRDENES *et al.*, (2002) avaliaram um método para quantificação de N-nitrosaminas voláteis por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês High-Performance Liquid Chromatography) com detetor de fluorescência. Para a determinação das N-Nitrosaminas voláteis em amostras de cervejas por HPLC foi necessário realizar derivatização em forno de microondas. A recuperação média das nitrosaminas variou entre 82,7-98,4 %. O limite de detecção foi de 8 a 75 pg para as diferentes N-nitrosaminas estudadas.

Outra técnica avaliada na separação e quantificação de N-nitrosaminas voláteis em amostras aquosas foi a eletroforese capilar eletrocinética micelar. Esta técnica foi avaliada por SANCHES FILHO *et al.*, (2003), apresentando limites de detecção entre 3,4 e 9,6 $\mu\text{g L}^{-1}$.

**CAPÍTULO IV – DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO
POR FIA COM DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA**

IV.1- INTRODUÇÃO

Nitrato e nitrito são freqüentemente monitorados em matrizes ambientais como água e solo e em matrizes alimentícias como vegetais e produtos curados.

Os sais de nitrato e nitrito são adicionados intencionalmente durante o processamento de alimentos de origem animal como embutidos e carnes curadas, tanto para conservar como para conferir sabor, aroma e cor avermelhada desejável ao produto. Por outro lado, os riscos toxicológicos mais relevantes gerados pela ingestão de nitrato são a metaemoglobinemia e a formação *in vivo* de N-nitrosaminas.

Várias metodologias têm sido propostas para a determinação quantitativa de nitrato e nitrito, incluindo métodos cinéticos (KOUPPARIS *et al.*, 1982; LIANG *et al.*, 1994), cromatográficos (SIU e HENSHALL, 1998; BUTT *et al.*, 2001), potenciométricos (LI *et al.*, 1994; SCHALLER *et al.*, 1994), amperométricos (BERTOTTI e PLETCHER, 1997), voltamétricos (XIMENES *et al.*, 2000), eletroforese capilar (ÖZTEKIN *et al.*, 2002) e espectrofotométricos (KAWAKAMI e IGRASHI, 1996; AOAC, 1997).

No entanto, o método mais empregado é o recomendado pela AOAC (1997), que envolve a redução do nitrato a nitrito em coluna de cádmio esponjoso e posterior determinação, por espectrofotometria na região do visível, do azo composto formado mediante reação do nitrito com ácido sulfanílico e N-(1-naftil) etilenodiamina (Reação de Griess). As desvantagens dessa metodologia são: emprego de substâncias potencialmente carcinogênicas, elevado consumo de reagentes e baixa frequência de amostragem.

Neste capítulo é apresentado o desenvolvimento de um método de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos. O método desenvolvido baseia-se na determinação do nitrato e nitrito através de um complexo ternário formado a partir de NO, ferro (II) e tiocianato em meio ácido. O complexo FeSCNNO^+ absorve na

região do visível em 460 nm, sendo que a absorvância é proporcional a concentração de nitrito e/ou nitrato. O NO é gerado em duas etapas: (i) redução do nitrato a nitrito em coluna de cádmio cuperizado e (ii) redução do nitrito a NO em meio de ácido sulfúrico.

O método proposto foi comparado com o método recomendado pela AOAC (AOAC, 1997) adaptado para um sistema de injeção em fluxo (GINÉ *et al.*, 1980).

IV.2- OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento e validação de método para a determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos por análise por injeção em fluxo (FIA), utilizando reagentes de baixo custo e não carcinogênicos.

IV.3 - PARTE EXPERIMENTAL

IV.3.1- EQUIPAMENTOS

O sistema FIA usado foi constituído de: bomba peristáltica de quatro canais (Ismatec, Suíça), tubos de Tygon com diâmetros internos variados (0,8; 1,2 e 1,4 mm d.i.), injetor proporcional de duas seções de comutação construído em acrílico, espectrofotômetro modelo 432 (Femto, Brasil) provido de cela de fluxo de vidro, com 10 mm de caminho ótico e registrador (Intralab, Brasil).

IV.3.2- REAGENTES

Os reagentes utilizados no desenvolvimento e aplicação do método para a determinação de nitrato e nitrito foram: H_2SO_4 95 % (Merck, Alemanha), $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 98,5% (Merck, Alemanha), KSCN 99 % (Merck, Alemanha), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 99,5% (Carlo Erba, Itália), NH_4Cl 99,8 % (Vetec, Brasil) e Na_2EDTA 99,5% (Synth, Brasil).

Os padrões analíticos de NaNO_2 e NaNO_3 foram adquiridos da Merck (Alemanha) apresentando pureza de 99%.

IV.3.3- AMOSTRAS

Foram analisadas amostras de produtos cárneos (salsichas e lingüiças tipo frescal) adquiridas em supermercados de Campinas – SP, no período de 2001 a 2002.

IV.3.4 PREPARO DE SOLUÇÕES

IV.3.4.1 SOLUÇÃO BÁSICA (C1)

A solução básica (NH_4Cl 1,87 mol L^{-1} , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,100 mol L^{-1} e Na_2EDTA $2,70 \cdot 10^{-3}$ mol L^{-1}) foi preparada em balão volumétrico de 1,00 L a partir da dissolução 100 g de NH_4Cl , 20,0 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 1,00 g de Na_2EDTA em água destilada. O pH da solução resultante foi ajustado para 8,5 com solução de NH_4OH .

IV.3.4.2 SOLUÇÃO DE FERRO (II) (R1)

A solução de ferro (II) $0,0100 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 0,392 g de $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ em H_2SO_4 1 mol L^{-1} em balão volumétrico de 100 mL.

IV.3.4.3 SOLUÇÃO DE TIOCIANATO (R2)

A solução de tiocianato $1,00 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 9,72g de KSCN em água destilada em balão volumétrico de 100 mL.

IV.3.4.4 SOLUÇÃO PADRÃO ESTOQUE DE NITRITO

Foi preparada uma solução padrão estoque de nitrito de concentração 100 mg L^{-1} a partir da dissolução de 0,150 g de NaNO_2 , previamente seco em estufa a 110°C por duas horas, em balão volumétrico de 1,00 L.

IV.3.4.5 SOLUÇÕES PADRÃO DE TRABALHO DE NITRITO

A partir da solução estoque de nitrito (IV.3.4.4), mediante diluição com água, foram preparadas diariamente soluções de nitrito de concentrações 0,300; 0,600; 0,900; 1,20; 1,50; 1,80; 2,10; 2,40; 2,70 e $3,00 \mu\text{g L}^{-1}$.

IV.3.4.6 SOLUÇÃO PADRÃO ESTOQUE DE NITRATO

Foi preparada uma solução estoque de nitrato de concentração 100 mg L^{-1} a partir da dissolução de $0,137 \text{ g}$ de NaNO_3 , previamente seco em estufa a 110°C por duas horas, em balão volumétrico de $1,00 \text{ L}$.

IV.3.4.7 SOLUÇÕES PADRÃO DE TRABALHO DE NITRATO

A partir da solução estoque de nitrato (IV.3.4.6), mediante diluição com água deionizada, foram preparadas diariamente soluções de nitrato de concentrações $1,00$; $3,00$; $5,00$; $7,00$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$.

IV.3.4.8 SOLUÇÃO DE ACETATO DE ZINCO

A solução de acetato de zinco $1,00 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de $22,0 \text{ g}$ de acetato de zinco com aproximadamente $80,0 \text{ mL}$ de água destilada quente. Na temperatura ambiente, esta solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com água destilada.

IV.3.4.9 SOLUÇÃO DE HEXACIANO FERRATO DE POTÁSSIO

A solução de hexacianoferrato de potássio $0,250 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução $10,6 \text{ g}$ de hexacianoferrato de potássio com água destilada em balão volumétrico de 100 mL .

IV.3.5 SISTEMA FIA

IV.3.5.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA FIA NA DETERMINAÇÃO DE NITRITO

O sistema FIA desenvolvido para a determinação de nitrito foi montado conforme esquema apresentado na Figura IV.1.

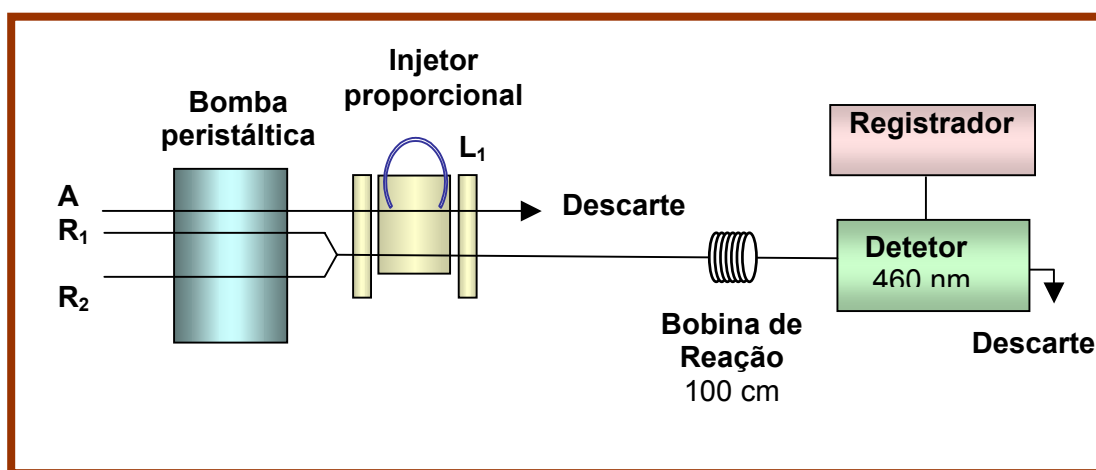


Figura IV.1 - Sistema FIA para a determinação de nitrito. A: amostra; R₁: $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Fe(II) em $6,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de H₂SO₄ ($1,2 \text{ mL min}^{-1}$); R₂: $0,40 \text{ mol L}^{-1}$ de SCN⁻ ($1,2 \text{ mL min}^{-1}$); L₁: alça de amostragem ($300 \mu\text{L}$).

O processo de otimização do sistema foi realizado de modo univariado. Para tanto, foi empregado nitrito na concentração $3,00 \text{ mg L}^{-1}$, correspondente ao ponto central de uma curva analítica obtida previamente. As condições estudadas estão descritas nas Tabelas IV.1 a IV.6.

Tabela IV.1 - Estudo do efeito da concentração de Fe(II)/H₂SO₄ na formação do complexo ternário FeSCNNO⁺. Sistema FIA (Figura IV.1).

Condições	Conc. de H ₂ SO ₄ (mol L ⁻¹)	Concentração dos reagentes coloriméticos		Volume da alça de amostragem (μL)	Vazão (mL min ⁻¹)	Bobina de reação (cm)
		Fe(II) (mol L ⁻¹)	SCN ⁻ (mol L ⁻¹)			
1	1 10 ⁻²	1,0 10 ⁻⁴				
2	3 10 ⁻²	3,0 10 ⁻⁴				
3	6 10 ⁻²	6,0 10 ⁻⁴	2,4 10 ⁻¹	300	1,2	100
4	9 10 ⁻²	9,0 10 ⁻⁴				
5	12 10 ⁻²	12 10 ⁻⁴				

Tabela IV.2 - Estudo do efeito da concentração de SCN⁻ na formação do complexo ternário FeSCNNO⁺. Sistema FIA (Figura IV.1).

Condições	Conc. de H ₂ SO ₄ (mol L ⁻¹)	Concentração dos reagentes coloriméticos		Volume da alça de amostragem (μL)	Vazão (mL min ⁻¹)	Bobina de reação (cm)
		Fe ²⁺ (mol L ⁻¹)	SCN ⁻ (mol L ⁻¹)			
1			0,03			
2			0,06			
3			0,12			
4			0,18			
5	6,0 10 ⁻²	6,0 10 ⁻⁴	0,24	300	1,2	100
6			0,30			
7			0,36			
8			0,40			
9			0,42			

Tabela IV.3 – Estudo do efeito da concentração de H_2SO_4 na formação do complexo ternário FeSCNNO^+ . Sistema FIA (Figura IV.1).

Condições	Conc. de H_2SO_4 (mol L ⁻¹)	Concentração dos reagentes coloriméticos		Volume da alça de amostragem (μL)	Vazão (mL min ⁻¹)	Bobina de reação (cm)
		Fe^{2+}	SCN^-			
		(mol L ⁻¹)	(mol L ⁻¹)			
1	$3,0 \cdot 10^{-2}$					
2	$6,0 \cdot 10^{-2}$					
3	$9,0 \cdot 10^{-2}$	$6,0 \cdot 10^{-4}$	0,40	300	1,2	100
4	$12 \cdot 10^{-2}$					

Tabela IV.4 - Estudo da influência do volume da alça de amostragem na formação do complexo ternário FeSCNNO^+ . Sistema FIA (Figura IV.1).

Condições	Conc. de H_2SO_4 (mol L ⁻¹)	Concentração dos reagentes coloriméticos		Volume da alça de amostragem (μL)	Vazão (mL min ⁻¹)	Bobina de reação (cm)
		Fe^{2+}	SCN^-			
		(mol L ⁻¹)	(mol L ⁻¹)			
1				50		
2	$6,0 \cdot 10^{-2}$	$6,0 \cdot 10^{-4}$	0,40	90	1,2	100
3				170		
4				300		

Tabela IV.5- Estudo da influência do comprimento da bobina de reação na formação do complexo ternário FeSCNNO^+ . Sistema FIA (Figura IV.1).

Condições	Conc. de H_2SO_4 (mol L ⁻¹)	Concentração dos reagentes coloriméticos		Volume da alça de amostragem (μL)	Vazão (mL min ⁻¹)	Bobina de reação (cm)
		Fe^{2+} (mol L ⁻¹)	SCN^- (mol L ⁻¹)			
1						50
2	$6,0 \cdot 10^{-2}$	$6,0 \cdot 10^{-4}$	0,40	300	1,2	100
3						150
4						200

Tabela IV.6- Estudo da influência da vazão dos reagentes na formação do complexo ternário FeSCNNO^+ . Sistema FIA (Figura IV.1).

Condições	Conc. de H_2SO_4 (mol L ⁻¹)	Concentração dos reagentes coloriméticos		Volume da alça de amostragem (μL)	Vazão (mL min ⁻¹)	Bobina de reação (cm)
		Fe^{2+} (mol L ⁻¹)	SCN^- (mol L ⁻¹)			
1					0,6	
2	$6,0 \cdot 10^{-2}$	$6,0 \cdot 10^{-4}$	0,40	300	1,2	100
3					1,4	
4					1,6	

IV.3.5.2- OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA FIA NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO

O sistema FIA empregado para a determinação de nitrato foi configurado conforme esquema da Figura IV.2.

A coluna de foi confeccionada conforme recomendado na literatura (FOLLET e RATCLIFF, 1963; GINÉ *et al.*, 1980). Com auxílio de um bastão de vidro introduziu-se lã de vidro na base inferior da coluna e em seguida o cádmio esponjoso em água. O cádmio esponjoso foi obtido a partir de bastões de zinco introduzidos em uma solução de sulfato de cádmio 20 % (m/v). O cádmio esponjoso depositado na superfície dos bastões foi recolhido, triturado por 3 segundos em liquidificador, passado em peneira com malha de 1,60 mm e lavado com ácido clorídrico 2 mol L⁻¹, por 3 min, e com adições sucessivas de água destilada até pH neutro. Em seguida, a coluna de cádmio foi cuperizada pela passagem de 50 mL de solução de sulfato de cobre 0,10% (m/v) em 0,10 mol L⁻¹ de EDTA e ativada pela passagem de 100 mL da solução C₁ (NH₄Cl + Na₂B₄O₇ + Na₂EDTA, pH 8,5): H₂O, 1:100 v/v e 50 mL de solução de NO₃⁻ 2 10⁻³ mol L⁻¹ (van STANDEN, 1982).

A reativação da coluna de cádmio foi realizada quando o sinal analítico (absorvância) diminuía cerca de 5%, passando-se sucessivamente pela coluna uma solução de ácido clorídrico 0,10 mol L⁻¹ por 5 minutos, água deionizada por 5 minutos para lavagem, e solução básica (C₁) durante 5 minutos.

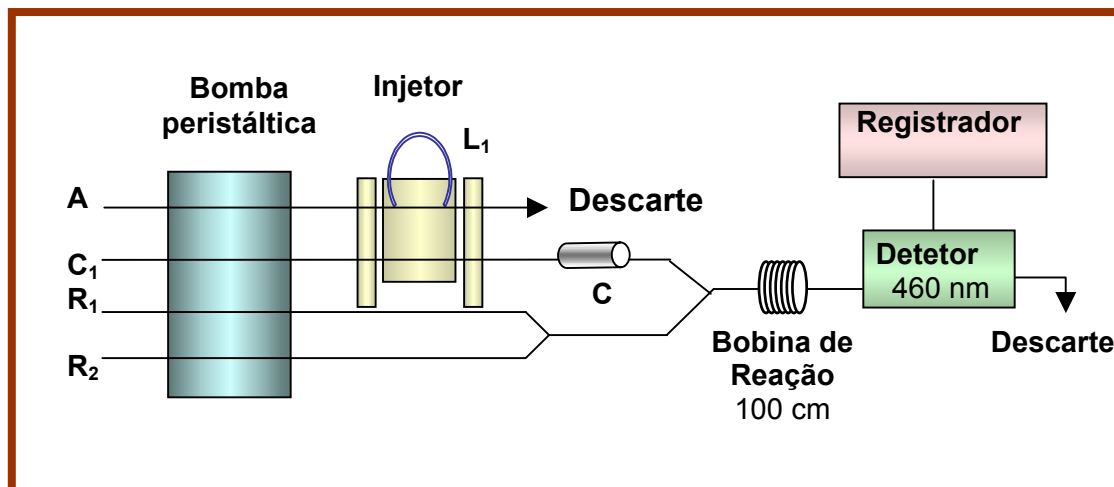


Figura IV.2 - Sistema FIA para a determinação de nitrato. A: amostra; C₁:(NH₄Cl + Na₂B₄O₇ + Na₂EDTA, pH 8,5): H₂O, 1:100 v/v (1,2 mL min⁻¹); R₁: 6,0 10⁻⁴ mol L⁻¹ de Fe(II) em 6,0 10⁻² mol L⁻¹ de H₂SO₄ (1,2 mL min⁻¹); R₂: 0,40 mol L⁻¹ de SCN⁻ (1,2 mL min⁻¹); L₁: alça de amostragem (300 µL); C: coluna de cádmio (75 mm x 3 mm).

Da mesma forma que o sistema FIA para a determinação de nitrito, foram realizados estudos para otimização do sistema na determinação de nitrato. Vários parâmetros do sistema foram avaliados e a concentração de nitrato utilizada nestes estudos foi de 3,00 mg L⁻¹. As concentrações de Fe(II) e SCN⁻ utilizadas nos ensaios foram 6,0 10⁻⁴ mol L⁻¹ em H₂SO₄ 0,060 mol L⁻¹ e 0,40 mol L⁻¹, respectivamente. A vazão dos reagentes foi de 1,2 mL min⁻¹, o comprimento da bobina de reação foi de 100 cm e o volume da alça de amostragem foi de 300 µL. Os parâmetros que foram variados se encontram descritos nas Tabelas IV.7 a IV.10.

Tabela IV.7 – Influência da diluição da solução básica na redução do nitrato a nitrito pela coluna de cádmio de 5 cm x 3 mm. Sistema FIA (Figura IV.2).

Condições	Solução básica : H ₂ O (v/v)	pH da solução
1	1:1	8,5
2	1:10	
3	1:100	
4	1:1000	

Tabela IV.8 – Influência do pH da solução básica na redução do nitrato a nitrito pela coluna de cádmio de 5 cm x 3 mm. Sistema FIA (Figura IV.2).

Condições	Solução básica : H ₂ O (v/v)	pH
1	1:100	7,5
2		8,0
3		8,5
4		9,0
5		9,5

Tabela IV.9 - Influência das dimensões da coluna de cádmio utilizada na redução do nitrato a nitrito. Sistema FIA (Figura IV.2).

Condições	Solução básica : H ₂ O (v/v)	pH	Dimensões da coluna de cádmio (diâmetro interno x comprimento)
1	1:100	8,5	3 mm x 5 cm
2			3 mm x 7,5 cm
3			3 mm x 10 cm
4			3 mm x 12 cm

Tabela IV.10 - Influência da vazão da solução básica utilizada na redução do nitrato a nitrito. Sistema FIA (Figura IV.2).

Condições	Solução básica : H ₂ O (v/v)	pH	Vazão (mL min ⁻¹)
1	1:100	8,5	0,6
2			1,2
3			1,4
4			1,6

IV.3.6- PREPARO DE AMOSTRA

Após otimizadas as condições para determinação de nitrato e nitrito, através da formação do complexo FeSCNNO^+ pelo sistema FIA, foi realizada a avaliação do preparo de amostras de salsichas e lingüiças.

IV.3.6.1- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DE NITRATO E NITRITO

Neste estudo, amostras de salsichas e lingüiças foram extraídas com água quente (70 °C) como descrito em IV.3.7.1 (pág. 65) e também com água à temperatura ambiente. Para avaliar o rendimento de extração do nitrato e nitrito à quente e à temperatura ambiente as amostras, em triplicata, foram fortificadas com a adição de 30 e 60% do valor nominal destes íons. Para tanto, foi utilizada metade da quantidade da amostra homogeneizada empregada na determinação de nitrato e nitrito.

IV.3.6.2- ESTUDO DA ESTABILIDADE DO NITRATO E NITRITO NA AMOSTRA PREVIAMENTE TRITURADA

Neste estudo, amostras de lingüiças e salsichas foram congeladas ao longo de 28 dias para verificar possíveis alterações no teor de nitrato e nitrito. Para tanto as amostras (triplicata) foram trituradas, separadas em porções de 5,0 g, congeladas em tubos de vidro de 50 mL e fortificadas com a adição de 30 e 60% do valor nominal destes íons. O nitrato e o nitrito foram extraídos das amostras e determinados em função do tempo: 0, 4, 8, 12, 20 e 28 dias.

IV.3.6.3- ESTUDO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO

Neste estudo, amostras de lingüiças fortificadas com a adição de 30 e 60% do valor nominal de nitrato e nitrito, foram submetidas ao processo de extração destes íons como descrito em IV.3.7.1 (pág. 65) e os extratos congelados para serem analisados ao longo de 28 dias. Os extratos foram analisados ao 0 dia, 4, 8, 12, 20 e 28 dias.

IV.3.7- ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PRODUTOS CÁRNEOS

As amostras de salsichas e lingüiças foram trituradas em liquidificador até a obtenção de uma massa homogênea, pesadas e submetidas à extração IV.3.7.1).

IV.3.7.1- EXTRAÇÃO DO NITRATO E NITRITO DA MATRIZ E CLARIFICAÇÃO DO EXTRATO

A extração do nitrato e nitrito foi realizada à partir da matriz triturada em solução aquosa a 70 °C. À amostra (5,00 g) foram adicionados 40,0 mL de água destilada pré-aquecida a 70 °C. A solução foi aquecida por 15 minutos em banho-maria em ebulição. Após esfriar, foram adicionados 2,00 mL de hexacianoferrato de potássio 0,25 mol L⁻¹ e 2,00 mL de acetato de zinco 1,00 mol L⁻¹ para clarificação do extrato, conforme descrito na literatura (AOAC, 1997). A solução permaneceu em repouso por 30 minutos, foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, seu volume completado com água destilada e em seguida a solução foi filtrada em papel de filtro qualitativo Whatman.

IV.3.7.2- DETERMINAÇÃO DO NITRATO E NITRITO POR FIA

O extrato obtido em IV.3.7.1 foi analisado por FIA, empregando o sistema apresentado nas Figuras IV.1 e IV.2. As condições empregadas foram: concentrações de Fe(II) e SCN^- $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,060 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,40 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. A vazão dos reagentes foi de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, o comprimento da bobina de reação foi de 100 cm e o volume da alça de amostragem foi de 300 μL .

A quantificação foi realizada por padronização externa. Para tanto, foi construída a curva analítica para nitrato e nitrito, na faixa de concentração de 1,00 a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,300 a $3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os extratos foram diluídos com água, de tal modo que o valor de absorvância se situasse no meio da curva analítica.

IV.3.8- VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Para garantir a confiabilidade do método analítico proposto para quantificar nitrato e nitrito foram avaliados os seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão, efeito matriz, limites de detecção, limites de quantificação e exatidão. A exatidão foi avaliada por comparação de resultados obtidos pelo método proposto com o método recomendado pela AOAC (1997) através da quantificação de nitrato e nitrito em amostras de lingüiças e salsichas.

Faixa linear: foram construídas curvas analíticas para o nitrito e nitrato no intervalo de concentração de 0,300 a $3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ para nitrito e 1,00 a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para nitrato.

Linearidade (r): calculadas a partir da regressão linear de cinco curvas analíticas obtidas em um mesmo dia, empregando soluções padrão de nitrato e nitrito no intervalo de concentração de 1,00 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,300 a 3,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Sensibilidade: calculada a partir do coeficiente angular médio das curvas analíticas obtidas para o nitrato e nitrito, respectivamente.

Limite de detecção (LOD): calculado a partir de cinco curvas analíticas pela seguinte expressão:

$$LOD = \frac{3s_{y/x}}{m} \quad (\text{IV.1})$$

onde $s_{y/x}$ é a estimativa do desvio padrão das curvas analíticas e “m” o coeficiente angular médios das curvas analíticas.

Limite de quantificação (LOQ): calculado a partir de cinco curvas analíticas pela seguinte expressão:

$$LOQ = \frac{10s_{y/x}}{m} \quad (\text{IV.2})$$

onde $s_{y/x}$ é a estimativa do desvio padrão das curvas analíticas e “m” o coeficiente angular médios das curvas analíticas. Os valores foram calculados para uma massa de amostra de 5,00 g.

Precisão intra-ensaio: foi avaliada mediante análise consecutiva (n=6) em um mesmo dia de uma solução contendo nitrito e nitrato na concentração de 1,50 e

5,00 µg mL⁻¹, respectivamente. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), obtido pela equação IV.3:

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{X}} 100 \quad (\text{IV.3})$$

s: estimativa do desvio padrão absoluto

$\bar{X}$: média dos resultados

Precisão inter-ensaio: foi avaliada mediante análise de uma solução contendo 1,50 e 5,00 µg mL⁻¹ de nitrato e nitrito, respectivamente, em cinco dias diferentes. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

Efeito matriz: avaliado mediante teste de recuperação. Para tanto, 2,50 g de amostras de lingüiças e salsichas foram fortificadas com nitrato e nitrito em dois níveis (30 e 60%) referente ao teor destes íons já presentes na amostra. A fortificação das amostras (triplicata) foi realizada através da adição de 390 e 780 µL de uma solução padrão de 1000 mg L⁻¹ contendo nitrato e nitrito.

Exatidão: foi avaliada mediante comparação de resultados obtidos na determinação de nitrato e nitrito em lingüiças pelo método FIA proposto e o método oficial (AOAC, 1997). Para tanto, foram analisadas três amostras de salsichas e três amostras de lingüiças em um mesmo dia.

IV.4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.4.1- DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM SISTEMA FIA

ZHAO e CAI, 1988 verificaram que a partir da reação do nitrito em meio ácido na presença de tiocianato e Fe (II) forma-se um complexo eletroativo que adsorve na superfície do eletrodo de mercúrio, sendo que a corrente é proporcional à concentração de nitrato. Posteriormente, XIMENES et al., 2000, empregaram Co (II) para a formação do complexo ternário e determinação de nitrato em vegetais por voltametria, com a vantagem da formação de NO fora do compartimento da cela voltamétrica, eliminando, assim, o efeito matriz.

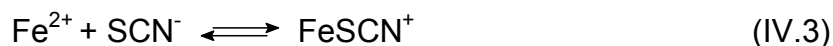
O método desenvolvido neste trabalho para determinação de nitrato e nitrito baseia-se na determinação do nitrato através do complexo ternário FeSCNNO^+ , formado a partir de NO, Fe(II) e SCN^- em meio ácido, utilizando um sistema por injeção em fluxo com detetor espectrofotométrico.

O NO é gerado a partir do íon nitrato em duas etapas:

(i) redução do nitrato a nitrito em coluna de cádmio cuperizado e

(ii) redução do nitrito a NO em meio de ácido sulfúrico.

As reações envolvidas na formação do complexo ternário estão descritas em IV.1 a IV.4:



O complexo FeSCNNO^+ absorve na região do visível do espectro eletromagnético com um máximo de absorvância em 460 nm, sendo que a absorvância é proporcional a concentração de nitrato e nitrito.

IV.4.1.1- OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA FIA NA DETERMINAÇÃO DE NITRITO

A formação do complexo ternário depende das concentrações de Fe(II), SCN^- e H_2SO_4 . Portanto, com o objetivo de estabelecer as condições analíticas ótimas para o sistema FIA (Figura IV.1, pág. 56), foi realizado um estudo univariado, sobre a influência das concentrações de Fe(II), SCN^- e H_2SO_4 no sinal analítico.

Inicialmente o sistema foi avaliado para a determinação de nitrito, sendo que foi variada a concentração de Fe(II) em H_2SO_4 (condições experimentais, vide tabela IV.1), mantendo-se constante a concentração de SCN^- . Os resultados obtidos neste estudo (Figura IV.3) indicam que o valor de absorvância aumenta com o aumento da concentração de Fe(II) até $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, permanecendo constante para concentrações maiores. Variando-se a concentração de SCN^- (Tabela IV.2) é verificado (Figura IV.4) um aumento da absorvância com o aumento da concentração desse íon até $0,40 \text{ mol L}^{-1}$, o que representa um máximo de absorvância para uma razão das concentrações de $\text{SCN}^- / \text{Fe(II)}$ igual a 600. O meio ácido é de grande importância na formação do complexo, pois é o responsável pela redução do nitrito a NO para posterior formação do complexo FeSCNNO^+ . Na Figura IV.5 (condições experimentais Tabela IV.3), pode-se verificar que a partir da concentração $0,060 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 o valor de absorvância permanece praticamente inalterado, sendo esta a concentração suficiente para reduzir quantitativamente o nitrito à NO.

Uma vez otimizadas as condições experimentais quanto aos reagentes, foi avaliado o volume da alça de amostragem e comprimento da bobina de reação (Figura IV.6, condições experimentais Tabelas IV.4 e IV.5). Entre os volumes de amostragem avaliados (100 a $300 \mu\text{L}$), o volume escolhido foi o de $300 \mu\text{L}$, por apresentar sensibilidade adequada. A bobina de reação de 100 cm apresentou o melhor resultado verificando-se, portanto, que a reação não é instantânea, pois em comprimentos menores a reação não se completou e, em bobinas de

comprimento maior que 100 cm, a dispersão no sistema leva a uma redução no sinal analítico.

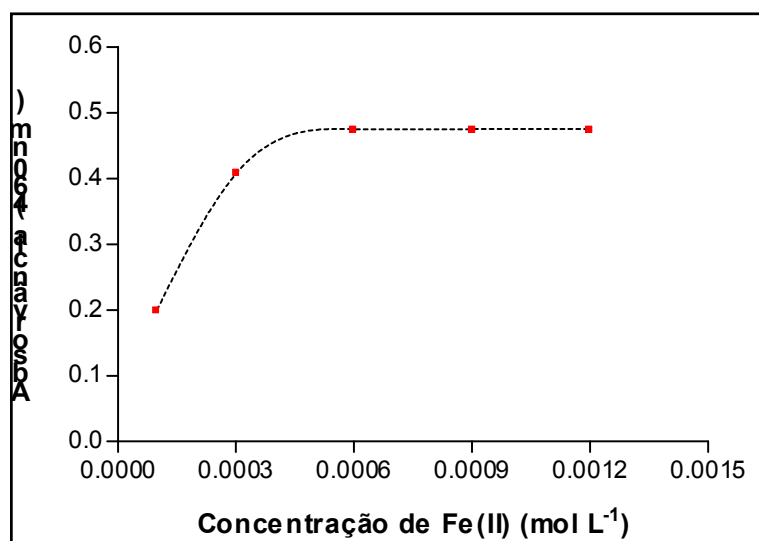


Figura IV.3 – Influência da concentração de Fe(II) na formação do complexo ternário. Influência da concentração de SCN⁻: 0,24 mol L⁻¹ e NO₂⁻: 3,0 mg L⁻¹.

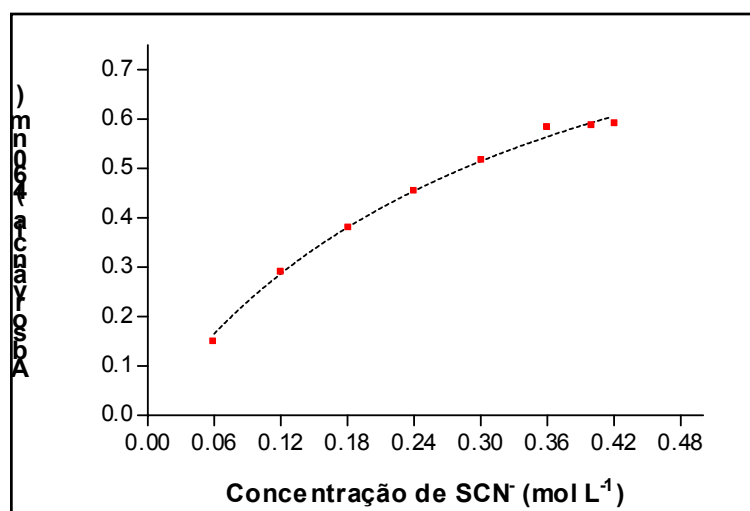


Figura IV.4 - Influência da concentração de SCN⁻ na formação do complexo ternário. Fe(II): 6,0 10⁻⁴ mol L⁻¹ em H₂SO₄ 0,060 mol L⁻¹ e NO₂⁻: 3,0 mg L⁻¹.

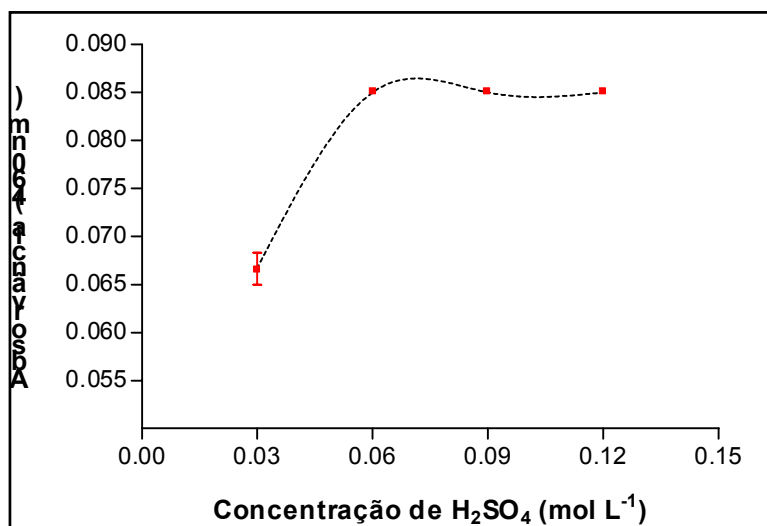


Figura IV.5 - Influência da concentração de H₂SO₄ na formação do complexo ternário. Fe(II): $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, SCN⁻: 0,40 mol L⁻¹ e NO₂⁻ 3,0 mg L⁻¹.

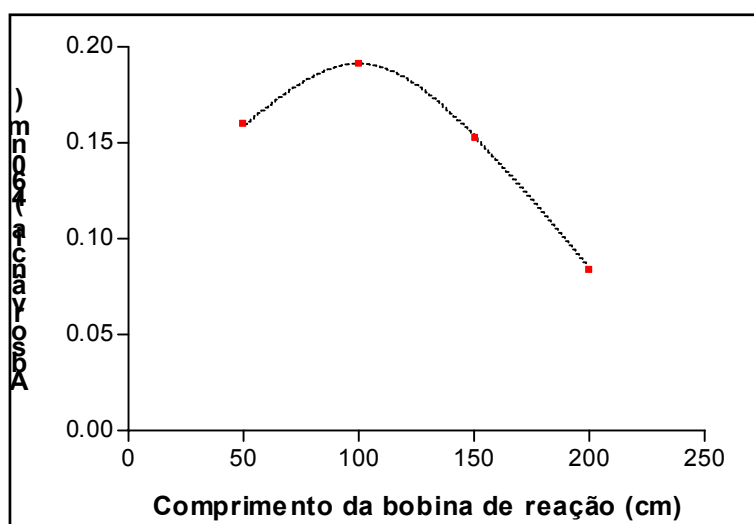


Figura IV.6 – Influência do comprimento da bobina da reação na formação do complexo ternário. Fe(II) $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ em H₂SO₄ 0,060 mol L⁻¹, SCN⁻ 0,36 mol L⁻¹ e NO₂⁻ 3,0 mg L⁻¹.

Nas condições experimentais ótimas estabelecidas foi construída uma curva analítica (absorvância em 460 nm vs. concentração do íon em mg L^{-1}) para nitrito. A curva obtida após otimização das condições de redução do nitrito a óxido nítrico e formação do complexo FeSCNNO^+ , no sistema FIA, está apresentada na Figura IV.7.

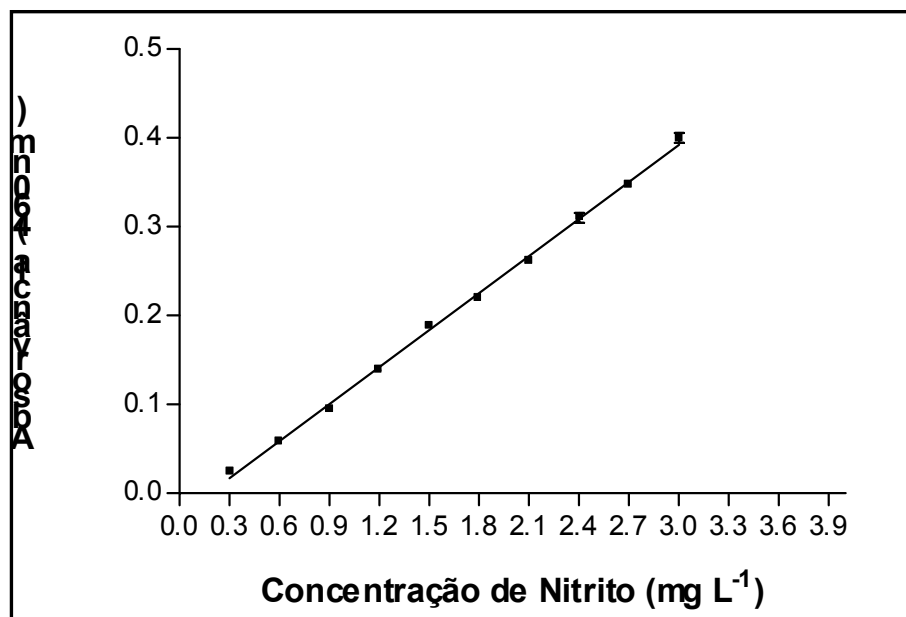


Figura IV.7 - Curva analítica para o nitrito determinado no sistema FIA ($n=3$).

A partir da curva analítica foram estabelecidas as seguintes figuras de mérito:

- Faixa linear dinâmica: 0,300 a 3,00 mg nitrito L^{-1} .
- Linearidade: 0,9969
- Sensibilidade: 0,139 unidades de absorvância L mg^{-1}

IV.4.1.2- OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA FIA NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO

O sistema FIA utilizado para a determinação de nitrato foi o mesmo que o empregado para o nitrito com a modificação da introdução do carregador C_1 e uma coluna de cádmio esponjoso (Figura IV.2, pág. 61). A coluna de cádmio tem a finalidade da redução do nitrato à nitrito anterior a reação de formação do complexo, que absorve em 460 nm. A confecção da coluna foi baseada no trabalho de GINÉ *et al.* (1980). A redução do nitrato à nitrito é favorecida em meio alcalino e como solução tem sido usada uma mistura de sais nas seguintes concentrações: NH_4Cl $1,87 \text{ mol L}^{-1}$, $Na_2B_4O_7$ $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e Na_2EDTA $2,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (FOLLET e RATCLIFF, 1963). No entanto, após a redução do nitrato o meio necessita ser neutralizado e acidificado para a geração do NO a partir do nitrito. Portanto, além do pH da solução é importante a avaliação da concentração desta solução. Diversas diluições foram realizadas, conforme apresentado na Tabela IV.7, pág. 62 e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela IV.11.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela IV.11, pode-se verificar que ocorrem pequenas variações nos valores de absorvância nas diluições da solução carregadora de 1:1 v/v, 1:10 v/v e 1:100 v/v. Nas soluções mais concentradas foi verificada a formação de bolhas no sistema ficando comprometida a repetibilidade. Sendo assim, optou-se por trabalhar com uma diluição de 1:100 v/v da solução C_1 , visto que com esta solução obteve-se além da sensibilidade, repetibilidade adequada do sinal analítico.

Tabela IV.11: Efeito da diluição da solução básica na redução do nitrato a nitrito

Diluição da solução C ₁ (v/v)	Absorvância média em 460 nm, (n=3)	S (n=3)
1:1	0,200	0,010
1:10	0,188	0,003
1:100	0,182	0,003
1:1000	0,160	-

S: estimativa do desvio padrão absoluto.

C1: NH₄Cl 1,87 mol L⁻¹ + Na₂B₄O₇ 0,10 mol L⁻¹ + Na₂EDTA 2,7 10⁻³ mol L⁻¹ (pH = 8,5)

A eficiência da coluna redutora contendo cádmio cuperizado no processo de redução depende do pH da solução C₁. No intervalo de pH de 7,5 a 9,5, a maior absorvância foi obtida em pH 8,5 (Figura IV.8 B).

A dependência da absorvância em função da vazão da solução C₁ está apresentada na Figura IV.8. A. A maior intensidade de sinal foi obtida com uma vazão de 1,2 mL min⁻¹, ou seja, em vazões maiores a reação não se completa e com vazões menores ocorre maior dispersão do analito no sistema.

O comprimento da coluna redutora de cádmio cuperizado também foi avaliado na redução do nitrato a nitrito, sendo que entre os comprimentos avaliados (5,0; 7,5; 10 e 12,5), a de 7,5 cm apresentou melhor eficiência na redução do nitrato nas condições empregadas (Figura IV.8 C).

A eficiência de redução da coluna de cádmio cuperizado foi determinada pela introdução de padrões de nitrato e nitrito de concentração 3,0 mg L⁻¹ pela alça de amostragem do sistema FIA (Figura IV.2, pág. 61) com e sem a coluna de cádmio. A eficiência de redução foi calculada em 78%.

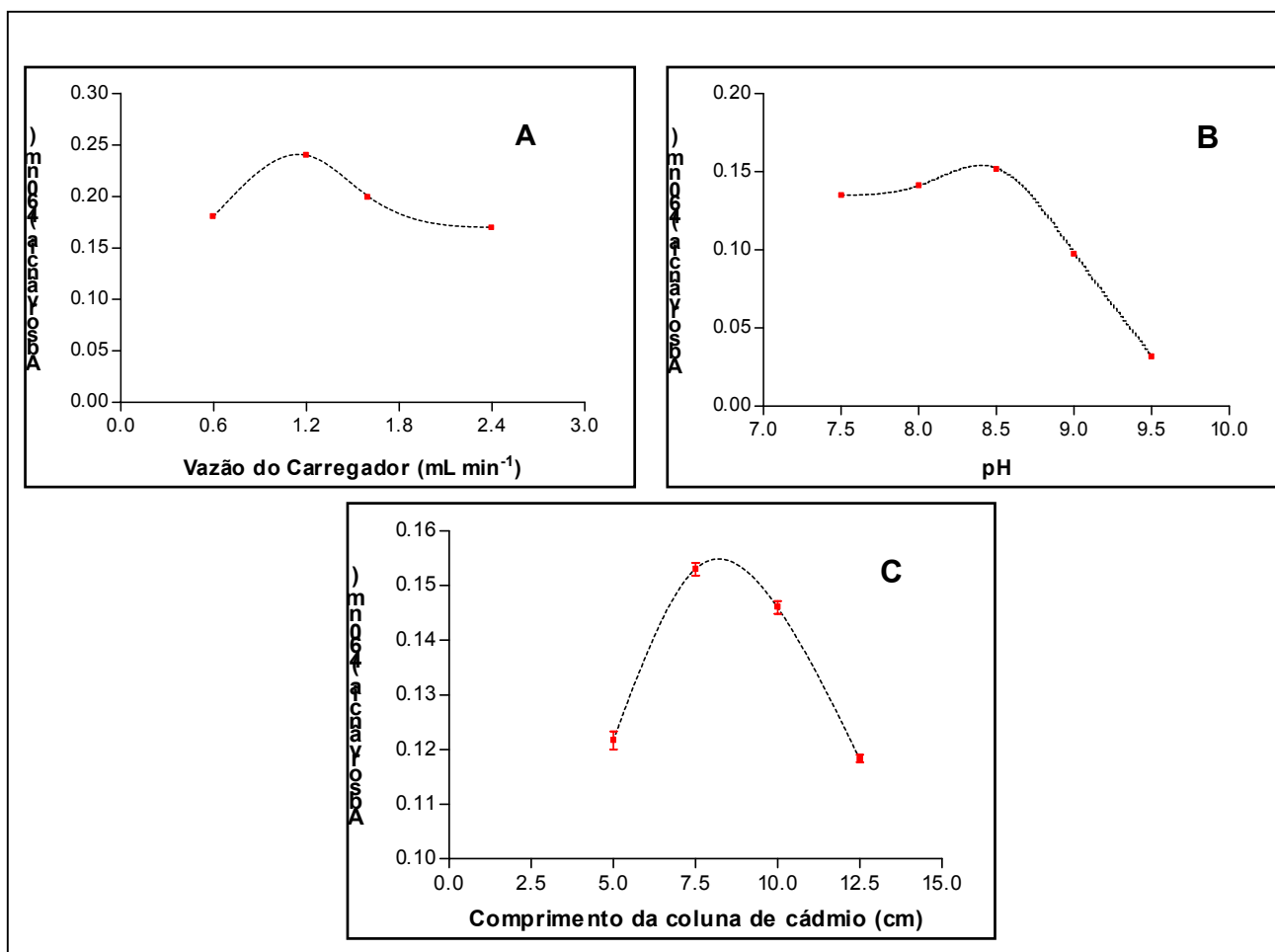


Figura IV.8 - (A) Vazão da solução C_1 1:100 v/v (pH 8,5). Concentração de Fe(II) $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,060 \text{ mol L}^{-1}$, SCN^- $0,36 \text{ mol L}^{-1}$, dimensão da coluna de cádmio $75 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$, e NO_3^- $3,0 \text{ mg L}^{-1}$; (B) Influência do pH da solução C_1 na formação do complexo FeSCNNO^+ ; Fe(II) $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,060 \text{ mol L}^{-1}$, SCN^- $0,36 \text{ mol L}^{-1}$, tamanho da coluna de cádmio $75 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$, diluição da solução básica 1:100 v/v, vazão da solução básica $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e NO_3^- $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e (C) Comprimento da coluna de cádmio nas condições: Fe(II) $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,060 \text{ mol L}^{-1}$, SCN^- $0,36 \text{ mol L}^{-1}$, pH da solução básica 8,5, diluição da solução básica 1:100 v/v, vazão da solução básica $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e NO_3^- $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ na formação do complexo FeSCNNO^+ .

Depois de otimizado o sistema FIA para a determinação de nitrato, foram introduzidas no sistema soluções padrão de nitrato no intervalo de concentração de 1,00 a 10,0 mg L⁻¹, obtendo-se a curva analítica apresentada na Figura IV.9.

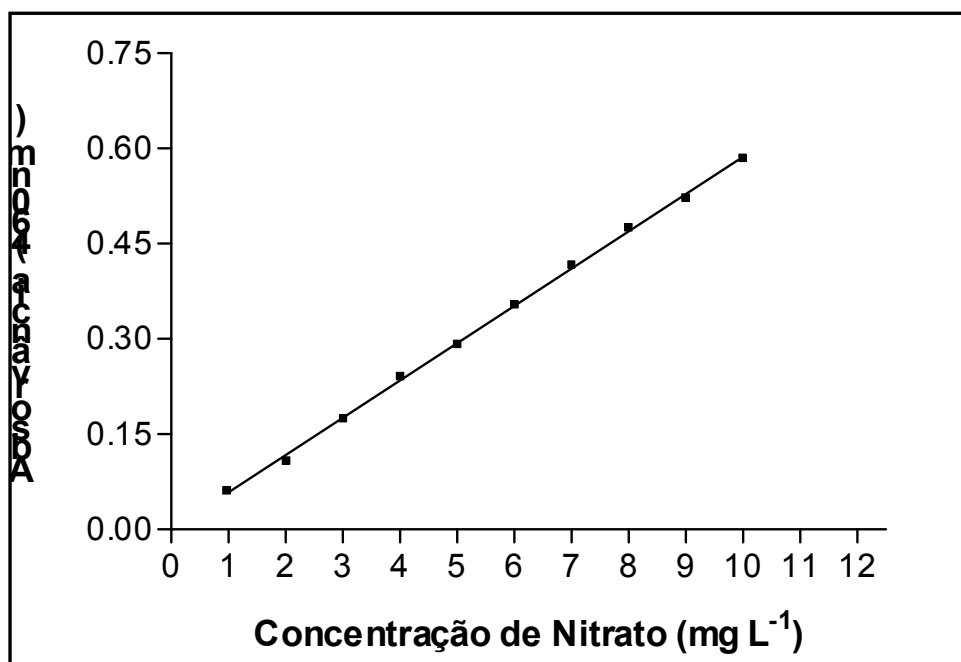


Figura IV.9: Curva analítica para o nitrato determinado no sistema FIA (n=3).

A partir da curva analítica foram estabelecidas as seguintes figuras de mérito:

- Faixa linear dinâmica: 1,00 a 10,0 mg nitrato L⁻¹
- Linearidade: 0,9986
- Sensibilidade: 0,0587 unidades de absorvância L mg⁻¹

IV.4.1.3- EFEITO MATRIZ NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM AMOSTRAS DE EMBUTIDOS

O método FIA desenvolvido anteriormente foi aplicado na determinação de nitrato em produtos cárneos, sendo que o efeito da matriz foi avaliado mediante teste de recuperação. Para tanto, amostras de salsichas foram fortificadas com nitrito e nitrato em dois níveis (30 e 60%) e as amostras de linguiças fortificadas somente com nitrato, uma vez que o nitrato não foi detectado nestas amostras. O procedimento foi realizado conforme descrito em IV.3.8. (pág. 66). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela IV.12. A recuperação média para os dois níveis de fortificação ficou no intervalo de 93 – 110 e 88 – 97% para nitrato e nitrito, respectivamente. As amostras apresentaram teor médio de nitrato e nitrito de 1,23 e 0,986 mg kg⁻¹ respectivamente.

Tabela IV.12 - Recuperação média (n=3) de nitrato e nitrito em amostras de embutidos para dois níveis de fortificação (30 e 60%).

Matriz	Recuperação $\pm$ RSD (%)			
	Nitrato		Nitrito	
	30%	60%	30%	60%
Lingüiça	110 $\pm$ 3	95 $\pm$ 3	*	*
Salsicha	105 $\pm$ 2	93 $\pm$ 1	88 $\pm$ 3	97 $\pm$ 3

RSD – estimativa do desvio padrão relativo.

* Abaixo do limite de detecção

IV.4.1.3.1- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DE NITRATO E NITRATO

O efeito da temperatura na extração do nitrato e nitrito foi avaliada com o intuito de verificar a possibilidade de extração do nitrato e nitrito da matriz de embutidos em água à temperatura ambiente, pois na extração à quente poderia ocorrer conversão do nitrato a nitrito. Portanto, foi avaliada a extração de nitrato e nitrito em produtos cárneos a 70 °C de acordo com o método da AOAC (1997) e a temperatura ambiente. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas IV.13 e IV.14 .

Tabela IV.13 - Recuperação média (n=3) de nitrato e nitrito por extração em água à temperatura ambiente e água à 70 °C na análise de amostras de lingüiças.

Fortificação	Extração à 70 °C		Extração à T _{ambiente}	
	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito
30%	97%	*	100 %	*
60%	100%	*	77 %	*

* Abaixo do limite de detecção

Tabela IV.14 - Recuperação média (n=3) de nitrato e nitrito por extração em água à temperatura ambiente e água à 70 °C na análise de amostras de salsichas.

Fortificação	Extração à 70°C		Extração à T _{ambiente}	
	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito
30%	113 %	109 %	60 %	76 %
60%	108 %	94 %	111%	48 %

Pelos valores da recuperação de nitrato e nitrito relacionados nas Tabelas IV.13 e IV.14 verifica-se que com o procedimento de extração com água à temperatura ambiente obteve-se uma menor taxa de recuperação em relação ao procedimento de extração à quente. Esses resultados sugerem que o procedimento de extração a 70 °C é o mais adequado na determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos. Segundo PHILLIPS, 1968 o aquecimento da amostra na extração de nitrato e nitrito se faz necessária, tanto para a inativação da enzima nitrato-redutase, quanto para a precipitação de proteínas. Portanto, com este procedimento evita-se a conversão do nitrato a nitrito na etapa de extração.

IV.4.1.3.2- ESTUDO DA ESTABILIDADE DO NITRATO E NITRITO NA AMOSTRA PREVIAMENTE TRITURADA

Neste estudo foram avaliadas possíveis alterações no teor de nitrato e nitrito em amostras de lingüiças e salsichas trituradas, homogeneizadas,

congeladas e analisadas ao longo de 28 dias. Para tanto, as amostras foram analisadas, em triplicata, nos dias 0, 4, 8, 12, 20 e 28 dias após o congelamento.

Verificou-se, pelos resultados apresentados nas Tabelas IV.15 e IV.16, que tanto a amostra de salsicha quanto a de lingüiça não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos teores de nitrato e nitrito quando congeladas ao longo de 28 dias. Este estudo foi importante no intuito de garantir a estabilidade dos analitos nas amostras para serem analisadas posteriormente, pois é relatado na literatura que 50% do nitrito adicionado nas carnes perde-se nas primeiras 24 horas e menos que 10% permanece depois de 7 dias em amostras estocadas em geladeira (PARDI e SANTOS, 1996).

Tabela IV.15: Teores de nitrato e nitrito em amostras congeladas de salsicha ao longo de 28 dias ($n = 3$).

Valor médio $\pm$ s (mg kg^{-1})		
Análise	Nitrato	Nitrito
0 dia	40 ± 2	$19,4 \pm 0,1$
4 dias	41 ± 1	$18,7 \pm 0,1$
8 dias	$37,1 \pm 0,5$	$18,9 \pm 0,3$
12 dias	38 ± 1	21 ± 3
20 dias	39 ± 1	$20,5 \pm 0,4$
28 dias	41 ± 3	$22,4 \pm 0,4$

s = Estimativa do desvio padrão absoluto ($n=3$)

Tabela IV.16: Teores de nitrato e nitrito em amostras congeladas de lingüiça ao longo de 28 dias (n = 3).

Valor médio $\pm$ s (mg kg ⁻¹)		
Análise	Nitrato	Nitrito
0 dia	253 $\pm$ 1	n.d.
4 dias	256 $\pm$ 1	n.d.
8 dias	245,2 $\pm$ 0,4	n.d.
12 dias	250 $\pm$ 3	n.d.
20 dias	239 $\pm$ 3	n.d.
28 dias	242 $\pm$ 2	n.d.

s = Estimativa do desvio padrão absoluto (n=3)

n.d. = não detectado

IV.4.1.3.3- ESTUDO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO

Este estudo foi realizado para verificar a possibilidade da extração de nitrato e nitrito em amostras de carnes em dias anteriores à determinação dos íons no sistema FIA. Para isto, os extratos foram congelados por até 28 dias, sendo o teor de nitrato e nitrito determinados em 4, 8, 12, 20 e 28 dias após o preparo da amostra. O teor de nitrito apresentou-se abaixo do limite de detecção do método.

Na amostra de lingüiça o teor de nitrato permaneceu estável ($p < 0,05$) no decorrer dos 28 dias nos extratos congelados. Os resultados são apresentados na Figura IV.10.

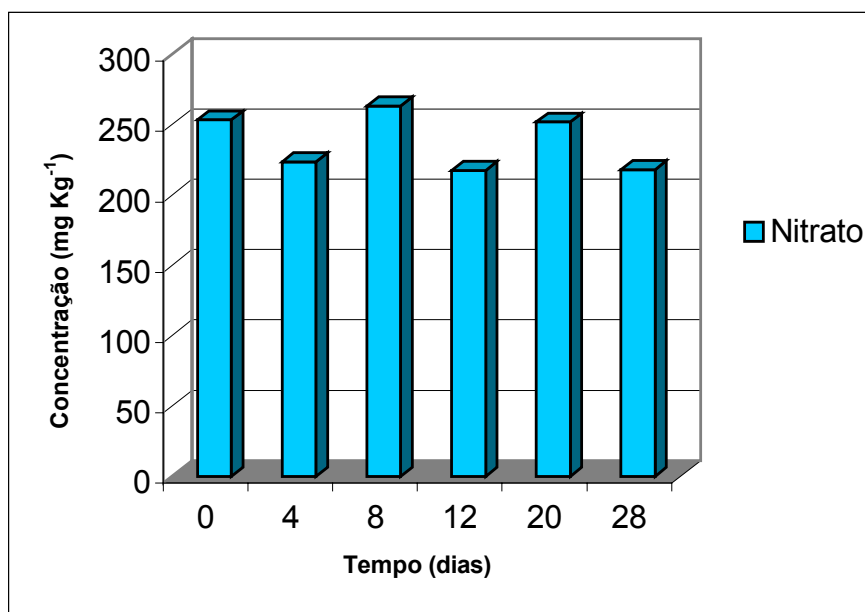


Figura IV.10 - Teores de nitrato no extrato de lingüiça congelada por um período de 28 dias.

IV.4.1.4- VALIDAÇÃO DO MÉTODO FIA

O método FIA proposto para a determinação de nitrato e nitrito em lingüiças foi validado por avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, recuperação em dois níveis, repetibilidade, limite de detecção e limite de quantificação, cujos procedimentos empregados estão descritos em IV.3.8. e os respectivos parâmetros estabelecidos estão apresentados na Tabela IV.17.

Tabela IV.17: Parâmetros de validação para o método proposto.

Parâmetros	Nitrato	Nitrito
Faixa linear (mg L ⁻¹)	1,00 – 10,0	0,300 – 3,00
Linearidade	0,9986	0,9969
Sensibilidade (unidades de absorvância L mg ⁻¹)	0,0587	0,139
Limite de detecção (mg L ⁻¹)	0,30	0,20
Limite de quantificação do método (mg kg ⁻¹)*	20	13
Recuperação (%)	93 - 110	88 - 97
Repetibilidade intra-ensaio (% RSD, n=6)		
(1) 1,00 mg L ⁻¹ NO ₃ ⁻ e 0,30 mg L ⁻¹ NO ₂ ⁻	3,78	3,50
(2) 3,00 mg L ⁻¹ NO ₃ ⁻ e 1,50 mg L ⁻¹ NO ₂ ⁻	1,19	1,06
(3) 5,00 mg L ⁻¹ NO ₃ ⁻ e 3,00 mg L ⁻¹ NO ₂ ⁻	0,760	0,930

* LOQ calculado para uma massa da amostra de 5,0 g.

A exatidão do método foi avaliada mediante comparação de resultados obtidos na determinação de nitrato e nitrito em amostras de lingüiças e salsichas pelo método proposto e o método recomendado pela AOAC, 1997 (Tabela IV.18). Cabe destacar, que o método da AOAC foi adaptado para o FIA.

Tabela IV.18 - Comparação do método desenvolvido com o método oficial da AOAC.

Amostras	Concentração de nitrito $\pm$ ts _{xo} (mg kg ⁻¹)		Concentração de nitrato $\pm$ ts _{xo} (mg kg ⁻¹)	
	Método proposto	Método AOAC	Método proposto	Método AOAC
Lingüiça				
1	n.d.	n.d.	86 $\pm$ 6	83 $\pm$ 4
2	39 $\pm$ 3	41 $\pm$ 3	59 $\pm$ 3	59 $\pm$ 5
3	n.d.	n.d.	84 $\pm$ 2	84 $\pm$ 3
Salsicha				
1	26 $\pm$ 5	28 $\pm$ 5	58 $\pm$ 6	56 $\pm$ 4
2	77 $\pm$ 5	76 $\pm$ 3	39 $\pm$ 5	38 $\pm$ 3
3	27 $\pm$ 3	28 $\pm$ 3	40 $\pm$ 5	43 $\pm$ 3

S_{xo} = Estimativa do desvio padrão da média (5 determinações) da concentração de nitrato e nitrito. t = t-distribuição com 95% de confiança com (n-2).

A frequência de determinação no sistema proposto após o preparo da amostra é de 30 e 40 determinações por hora para nitrato e nitrito, respectivamente.

A partir da Tabela IV. 16 verifica-se que os resultados obtidos na determinação de nitrato e nitrito em lingüiças e salsichas pelo método proposto não diferem significativamente ($P < 0,05$) dos valores determinados pelo método

da AOAC e, portanto, indica que o método proposto é exato, ou seja, não existe evidência da presença de erros sistemáticos.

IV.5. CONCLUSÃO

O método de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica desenvolvido para determinação de nitrato e nitrito, através do complexo ternário FeSCNNO^+ , é adequado para o monitoramento de nitrato e nitrito em produtos cárneos.

O método FeSCNNO^+ , apresentou em relação ao método espectrofotométrico oficial recomendado pela AOAC, as seguintes vantagens: emprego de reagentes não carcinogênicos, baixo consumo de reagentes, elevada frequência analítica quando comparado com o método realizado em batelada e menor manipulação das amostras.

Quanto às amostras analisadas, estas se mostraram dentro do limite aceitável pela legislação que é de 150 e 300 mg kg^{-1} para nitrito e nitrato, respectivamente.

**CAPÍTULO V – ESTABELECIMENTO DAS
CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA
SEPARAÇÃO DAS NITROSAMINAS VOLÁTEIS
POR GC-TEA E GC-MS**

V.1- INTRODUÇÃO

A análise de resíduos de nitrosaminas em alimentos requer o emprego de métodos de separação e o emprego de detetores seletivos com adequada detectabilidade.

As N-nitrosaminas voláteis são normalmente separadas e quantificadas por cromatografia gasosa com detetores específicos. O detetor de quimiluminescência (TEA, do inglês Thermal Energy Analyzer) é indicado na literatura como sendo o detetor mais empregado na determinação de N-nitrosaminas voláteis, em função de sua elevada seletividade. Porém, é recomendada a confirmação de identidade das N-nitrosaminas pelo detetor de massas.

Durante anos, a espectrometria de massas foi empregada isoladamente no estudo e elucidação das estruturas de substâncias orgânicas. Hoje, sua utilização está mais difundida, devida a sua associação, através de interface, com a cromatografia gasosa, cromatografia líquida e plasma indutivamente acoplado, na qual o espectrômetro de massas é usado como detetor de alta seletividade e sensibilidade.

A cromatografia gasosa acoplada ao detetor de massas pode ser usada tanto na confirmação de identidade quanto na quantificação das N-nitrosaminas voláteis. Porém, para a quantificação de substâncias em baixas concentrações, como no caso das N-nitrosaminas é necessário trabalhar no modo seleção de íons (SIM, do inglês Selected Ion Monitoring).

O princípio de funcionamento do TEA baseia-se na clivagem da ligação N-NO, formando um radical nitrosila, que, por sua vez, reagindo com ozônio forma dióxido de nitrogênio no estado excitado (NO_2^*). Ao decair para o estado fundamental ocorre emissão de radiação luminescente em 600 nm. Dependendo do limite de detecção requerido, pode ser necessário a concentração prévia do

analito, podendo neste caso o GC-TEA atingir limites de detecção abaixo de 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (RAOUL *et al.*, 1997; SEN *et al.*, 1997).

Entretanto, com um cromatógrafo à gás acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução é possível a determinação de traços de N-nitrosaminas, na faixa de 0,5-1,0 mg L^{-1} (SANCHES FILHO *et al.*, 2003). Portanto, o GC-MS é um método complementar ao GC-TEA para a confirmação de identidade das nitrosaminas.

V.2- OBJETIVOS

O objetivo geral foi estabelecer as condições cromatográficas para a separação, quantificação e confirmação das N-nitrosaminas por cromatografia gasosa com os detetores de quimiluminescência e detetor de massas.

V.3- PARTE EXPERIMENTAL

V.3.1- INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

V.3.1.1- CROMATOGRAFIA GASOSA – DETETOR TEA

As análises por GC-TEA foram realizadas em um equipamento Agilent Modelo 6890 (Agilent, EUA), acoplado a um detetor TEA Modelo 610 (Thermo Orion, EUA) operando no modo nitrosaminas. As temperaturas da interface e de pirólise foram ajustadas em 250 °C e 550 °C, respectivamente. A coluna usada foi megabore HP-INOWAX (100% polietilenoglicol), 30 m x 530 μm , d.i.1 μm (Agilent,

EUA). Foram realizadas injeções de 2 μ L no modo *splitless*. A temperatura do injetor foi de 200 °C e como gás de arraste foi usado hélio a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. A temperatura do forno seguiu a seguinte programação: 100 °C (5 min), 20 °C/min até 160 °C (3 min).

V.3.1.2– CROMATOGRAFIA GASOSA – DETETOR MS

As análises por GC-MS foram realizadas em um instrumento HP 5890 série II acoplado ao detetor de massas HP 5971 (Hewlett Packard, EUA) e injetor automático HP 7673. A coluna capilar usada foi CP-WAX (100% polietilenoglicol), 30 m x 250 μ m, d.i. 0,25 μ m (Varian, EUA).

As injeções foram realizadas automaticamente (1 μ L) no modo *splitless* com o injetor a 250 °C. A vazão do gás de arraste (hélio) foi de 1 mL min⁻¹.

Várias programações de temperatura foram avaliadas e a mais satisfatória para a separação das nitrosaminas em estudo foram: T_{coluna} = 50 °C (5 min), 5 °C/min até 180 °C, com a temperatura do injetor e detetor à 250 °C e 280 °C, respectivamente.

Para a quantificação das nitrosaminas, o detetor de massas foi utilizado no modo SIM, atribuindo a cada analito o fragmento mais abundante para ser usado como íon de quantificação (IQ) e outros dois íons para identificação (II), considerando o tempo de eluição de cada analito. Os tempos de retenção e as abundâncias relativas de IQ e II foram utilizados como critério de identificação.

V.3.2 - PADRÕES ANALÍTICOS

Os padrões analíticos adquiridos junto a Sigma-Aldrich (EUA) foram: N-Nitrosodimetilamina (99,99 %), N-nitrosodietilamina (99,99 %), N-nitrosopiperidina (99,99 %), N-nitrosopirrolidina (99,99 %) e N-nitrosopropilbutilamina (99,99%).

V.3.3 - SOLVENTES E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram grau analítico. O metanol utilizado no preparo das soluções padrão foi nanograde da Mallinckrodt (México).

V.3.4 - SOLUÇÕES

V.3.4.1 - SOLUÇÃO ESTOQUE DE NDMA, NDEA, NPIP, NPIR E NPBA

As soluções de NDMA, NDEA, NPBA, NPIR e NPIP na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas a partir da diluição de $10 \mu\text{L}$ do padrão analítico em metanol em balões volumétricos de 10 mL .

V.3.4.2 - SOLUÇÕES DE TRABALHO DE NDMA, NDEA, NPIP, NPIR E NPBA

Uma solução trabalho de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada a partir da diluição de 1 mL da solução estoque de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol em balão volumétrico de 10 mL .

Uma solução trabalho de NPBA $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada a partir da diluição de 1 mL da solução estoque de NPBA $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol em um balão volumétrico de 10 mL.

A partir das soluções trabalho de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada uma solução $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a partir desta uma solução $0,100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o preparo da curva analítica. Soluções de NPBA $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,100 \mu\text{g mL}^{-1}$ também foram preparadas para serem utilizadas como padrão interno.

V.3.4.3 – SOLUÇÕES PARA CURVA ANALÍTICA DE 5 A 60 ng mL^{-1}

Aos balões volumétricos de 10 mL foram adicionadas alíquotas de 50,0; 100; 200; 300; 400; 500 e 600 μL da solução trabalho de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 300 μL da solução trabalho de NPBA $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo o volume completado com metanol. Foram obtidas, desta forma, soluções de trabalho de concentrações 5,00; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e $60,0 \text{ ng mL}^{-1}$ de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR, utilizadas na construção da curva analítica tendo a NPBA como padrão interno.

V.3.4.4 - SOLUÇÕES PARA CURVA ANALÍTICA DE 10 A 110 ng mL^{-1}

Aos balões volumétricos de 10 mL foram adicionadas alíquotas de 100; 300; 500; 700; 900 e 1100 μL da solução trabalho de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 700 μL da solução trabalho de NPBA $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo o volume completado com metanol. Foram obtidas, desta forma, soluções de trabalho de concentrações 10,0; 30,0; 50,0; 70,0; 90,0 e 110 ng mL^{-1} de NDMA,

NDEA, NPIP e NPIR, utilizadas na construção da curva analítica tendo a NPBA como padrão interno.

V.3.4.5 - SOLUÇÕES PARA CURVA ANALÍTICA DE 50 A 500 ng mL⁻¹

Aos balões volumétricos de 50 mL foram adicionadas alíquotas de 2,5; 5; 10; 15; 20 e 25 mL da solução trabalho de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR 1,00 µg mL⁻¹ e 15 mL da solução trabalho de NPBA 1,00 µg mL⁻¹, sendo o volume completado com metanol. Foram obtidas, desta forma, soluções de trabalho de concentrações 50,0; 100; 200; 300; 400 e 500 ng mL⁻¹ de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR, utilizadas na construção da curva analítica, tendo a NPBA como padrão interno.

V.3.5 - ADEQUABILIDADE DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Os parâmetros empregados para avaliar a separação cromatográfica das N-nitrosaminas no GC-TEA foram: fator de retenção (k), resolução (Rs) e fator de separação (α). Esses parâmetros foram calculados a partir de valores extraídos dos cromatogramas, utilizando as equações de acordo com BRUCE *et al.*, 1998.

Uma vez otimizadas as condições analíticas para a separação e quantificação das nitrosaminas por GC-TEA foram construídas curvas analíticas (com seis pontos de concentração em triplicata) para todas nitrosaminas em estudo. Para tanto, foram determinados alguns parâmetros de validação do método como: faixa linear, linearidade, sensibilidade, detectabilidade e precisão intra-ensaio.

Alíquotas de 2 μL das soluções de trabalho de concentrações 5,00; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR, foram injetadas no GC-TEA em triplicata, para avaliar a faixa linear e a linearidade de resposta do detetor. Outra faixa de trabalho também foi avaliada 10,0; 30,0; 50,0; 70,0; 90,0 e 110 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A sensibilidade foi calculada a partir do coeficiente angular médio das curvas analíticas obtidas para as nitrosaminas em estudo.

As detectabilidades para todas as N-nitrosaminas estudadas foram estimadas com padrões, realizando-se sucessivas diluições e determinando a menor quantidade detectável, considerando uma relação sinal/ruído igual a 3.

A precisão intra-ensaio foi avaliada através de seis análises de uma solução de NDMA, NDEA, NPIR e NPIP na concentração de 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para avaliar a estabilidade das soluções padrão, uma solução contendo 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR, foi injetada em cinco dias diferentes. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

V.4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.4.1- DETERMINAÇÃO DE N-NITROSAMINAS POR GC-TEA

Para a determinação de nitrosaminas foi empregado um cromatógrafo à gás acoplado a um detetor de quimiluminescência (GC-TEA).

O detetor de quimiluminescência foi operado no modo Nitrosaminas, no qual a amostra juntamente com o gás de arraste é introduzida dentro de um pirolisador catalítico onde ocorre clivagem nas ligações N–NO ou N–NO₂, liberando o radical nitrosila (NO $\cdot$). Os produtos originados desta reação passam através de uma câmara de resfriamento onde há remoção de sub-produtos indesejáveis. No vácuo, os radicais NO $\cdot$ são introduzidos dentro da câmara de

reação contendo ozônio, onde são oxidados. O produto desta reação, dióxido de nitrogênio (NO_2^*) no estado excitado, quando decai ao estado fundamental emite radiação na região do visível (600 nm). Esta radiação é detectada por um tubo fotomultiplicador e é proporcional a quantidade de radicais nitrosila presentes na amostra e, conseqüentemente, à concentração de nitrosaminas.

As condições de temperatura da coluna do cromatógrafo à gás foram otimizadas para permitir a separação da NDMA, NDEA, NPBA, NPIP e NPIR. A NPBA não é encontrada em produtos cárneos e seria um potencial padrão interno. Um cromatograma característico está apresentado na Figura V.1.

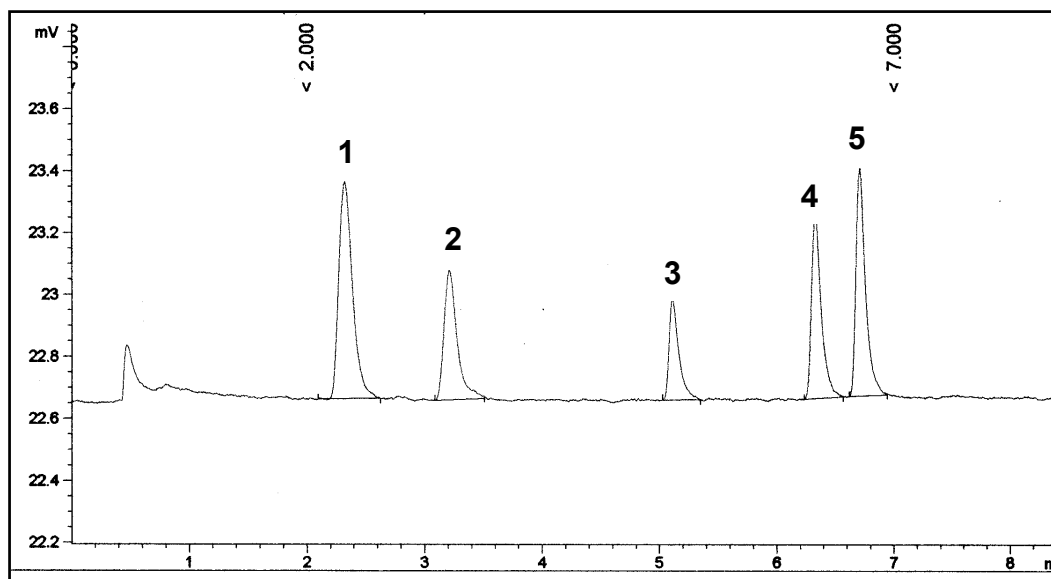


Figura V.1 - Cromatograma de uma solução padrão contendo 50 ng mL^{-1} de 1-NDMA ($t_R = 2,3 \text{ min.}$); 2-NDEA ($t_R = 3,2 \text{ min.}$); 3-NPBA ($t_R = 5,1 \text{ min.}$); 4-NPIP ($t_R = 6,3 \text{ min.}$) e 5-NPIR ($t_R = 6,7 \text{ min.}$). Condições cromatográficas: Coluna Megabore HP-INOWAX, Temperatura da coluna: 100°C (3 min), 40°C/min 140°C , 5°C/min até 160°C , Temperatura do injetor: 200°C , Temperatura de pirólise do detector: 550°C , Temperatura da interface do detector: 250°C , Volume injetado: $2 \mu\text{L}$ modo *splitless*, Vazão do gás de arraste (He): $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Para o desenvolvimento do método cromatográfico foram considerados os seguintes parâmetros: adequabilidade do sistema (N, R_s , α , k), faixa linear linearidade, sensibilidade, repetibilidade e detectabilidade (Tabelas V.1 e V.2). Enquanto os parâmetros da adequabilidade do sistema foram estabelecidos a partir dos cromatogramas, os demais termos foram calculados a partir das curvas analíticas para cada analito em questão. As curvas analíticas, empregando o GC-TEA, para a NDMA, NDEA, NPIR e NPIP estão apresentadas na Figura V.2.

Tabela V.1 - Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico.

Parâmetros de adequabilidade do sistema	NDMA	NDEA	NPBA	NPIP	NPIR
Número de pratos (N)	529	1021	4611	7069	7947
Fator de retenção (k)	3,60	5,40	9,20	11,6	12,4
	NDEA/ NDMA	NPBA/NDEA	NPIP/NPBA	NPIR/NPIP	
Resolução (R_s)	2,23	5,42	4,04	1,27	
Fator de Separação (α)	1,38	1,59	1,24	1,06	

Quanto ao fator de retenção (k) todos os resultados se apresentaram dentro do valor ótimo recomendado pela literatura ($k > 2$) (BRUCE *et al.*, 1998). Para quantificação é recomendado uma resolução mínima de 1 entre os dois picos mais próximos, e todos os resultados se apresentaram dentro do recomendado ($R_s > 1$) (BRUCE *et al.*, 1998). Estes parâmetros indicam separação adequada das nitrosaminas nas condições estabelecidas.

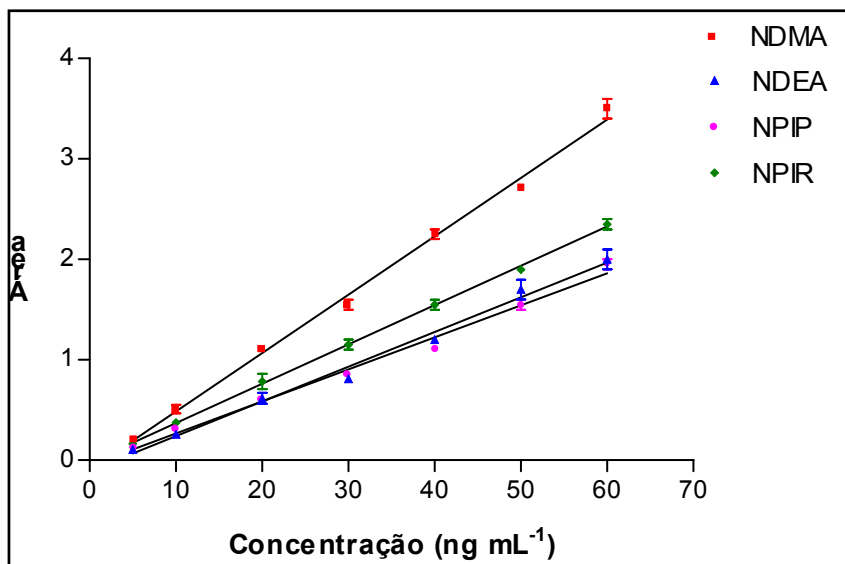


Figura V.2 – Curvas analíticas ($n=3$), obtidas por GC-TEA para as nitrosaminas: NDMA, NDEA, NPIP e NPIR.

Tabela V.2 - Parâmetros analíticos obtidos na detecção de N-nitrosaminas usando GC-TEA.

Parâmetros analíticos	NDMA	NDEA	NPIP	NPIR
Faixa linear (ng mL ⁻¹)	5,00 a 60,0	5,00 a 60,0	5,00 a 60,0	5,00 a 60,0
Linearidade	0,9989	0,9911	0,9931	0,9979
Sensibilidade (u.a. mL ng ⁻¹)	0,058	0,035	0,032	0,039
Repetibilidade (% RSD, n=6) 10 ng mL ⁻¹	5,83	7,62	6,80	8,62
Repetibilidade (% RSD, n=6) 50 ng mL ⁻¹	3,21	8,10	4,82	2,91
Detectabilidade (pg)*	5	8	7	4

(*) A detectabilidade (D) foi calculada a partir da curva analítica, u.a.: unidades de área

Foi verificado que existe uma relação linear entre a concentração das nitrosaminas sob estudo e área para concentrações até 110 ng mL⁻¹. Pelos resultados obtidos verifica-se que o detetor TEA apresenta sensibilidade adequada para a quantificação da NDMA, NDEA, NPIP e NPIR em produtos cárneos.

V.4.2- DETERMINAÇÃO DE N-NITROSAMINAS POR GC-MS

Apesar da seletividade do detetor de quimiluminescência é recomendada a confirmação de identidade por outra técnica. Considerando a concentração das nitrosaminas na amostra a nível de $\mu\text{g kg}^{-1}$, a volatilidade do analito e a complexidade de matriz, a técnica mais indicada é a cromatografia gasosa acoplada ao detetor de massas (GC-MS).

Para o estabelecimento das condições cromatográficas, as nitrosaminas foram injetadas no GC-MS operando no modo “full scan”. Os cromatogramas obtidos forneceram os espectros de massas individuais das nitrosaminas, através dos quais foi possível selecionar um íon de quantificação e outros dois íons de identificação para cada composto (Tabela V.3), seleção baseada nos fragmentos de maior abundância. Essa informação é imprescindível para a construção da tabela de programação do detetor de massas no seu modo de quantificação, ou seja, no modo SIM (do inglês “Selected Ion Monitoring”), assim como o tempo de retenção dos compostos.

A Figura V.3 apresenta um cromatograma referente a separação das nitrosaminas estudadas. Os respectivos espectros de massas de cada analito são mostrados nas Figuras V.4, V.5, V.6 e V.7. As condições cromatográficas foram descritas em V.3.1.2.

Tabela V.3 - Íons utilizados na programação do detetor de massas no modo SIM para determinação de nitrosaminas.

Janela (min)	IQ	II	Composto
6 – 9,5	74	42, 43	NDMA
9,5 - 16	102	44, 56	NDEA
16 - 25	130	70, 27	NPBA
	114	55, 83	NPIP
	100	39, 68	NPIR

IQ: Íons de quantificação

II: Íons de identificação

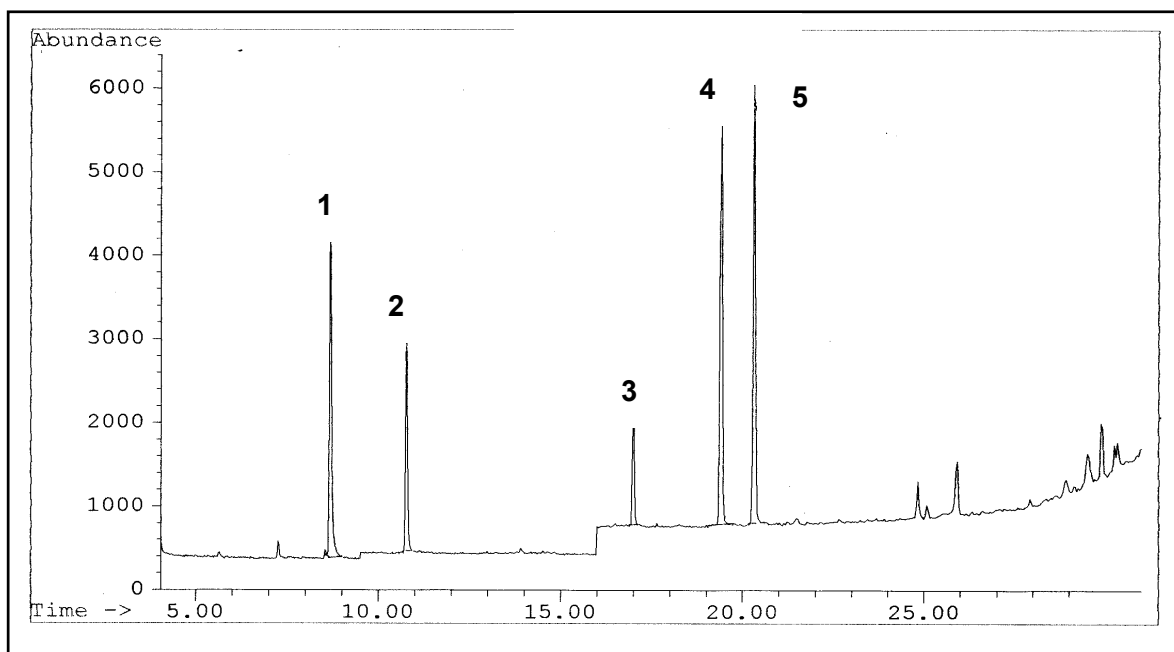


Figura V.3- Cromatograma (GC-MS) de uma solução padrão contendo 100 ng mL⁻¹ de 1- NDMA t_R = 8,70 min.; 2- NDEA t_R = 10,79 min.; 3- NPBA t_R = 17,01min.; 4- NPIP t_R = 19,43 min. e 5- NPIR t_R = 20,32 min. Condições cromatográficas: coluna capilar CP-WAX, T_{coluna} = 50 °C (5 min), 5 °C/min até 180 °C, $T_{injetor}$ = 250 °C, $T_{detetor}$ = 280 °C, $V_{injetado}$ = 1 µL, vazão do gás de arraste (He) = 1 mL min⁻¹.

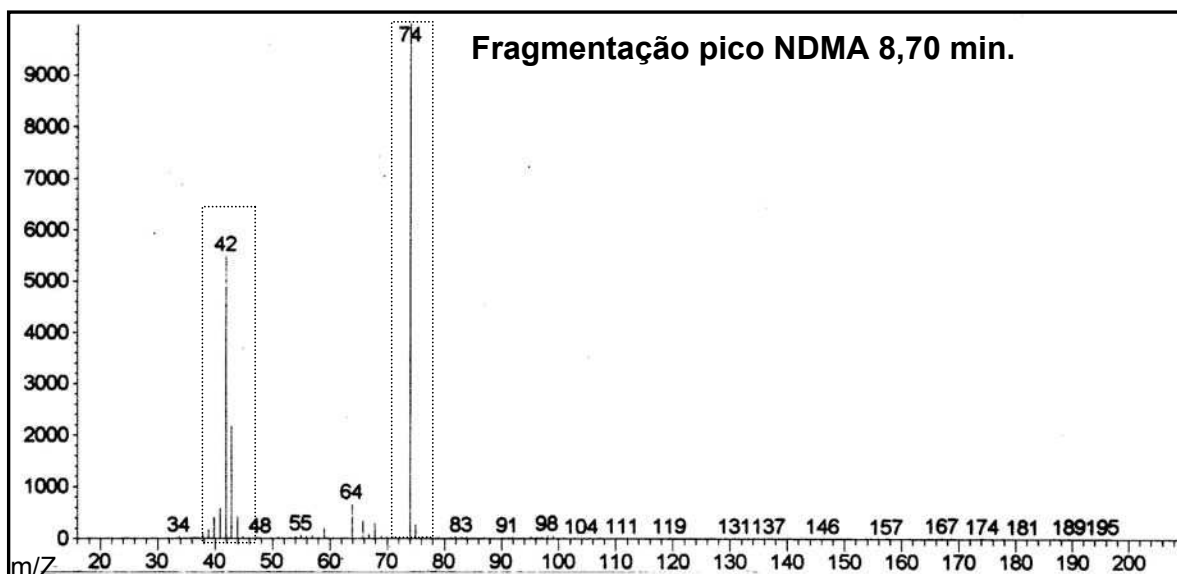


Figura V.4 - Espectro de fragmentação obtido por GC-MS do padrão analítico NDMA (100 ng mL^{-1}). Condições cromatográficas descritas no texto.

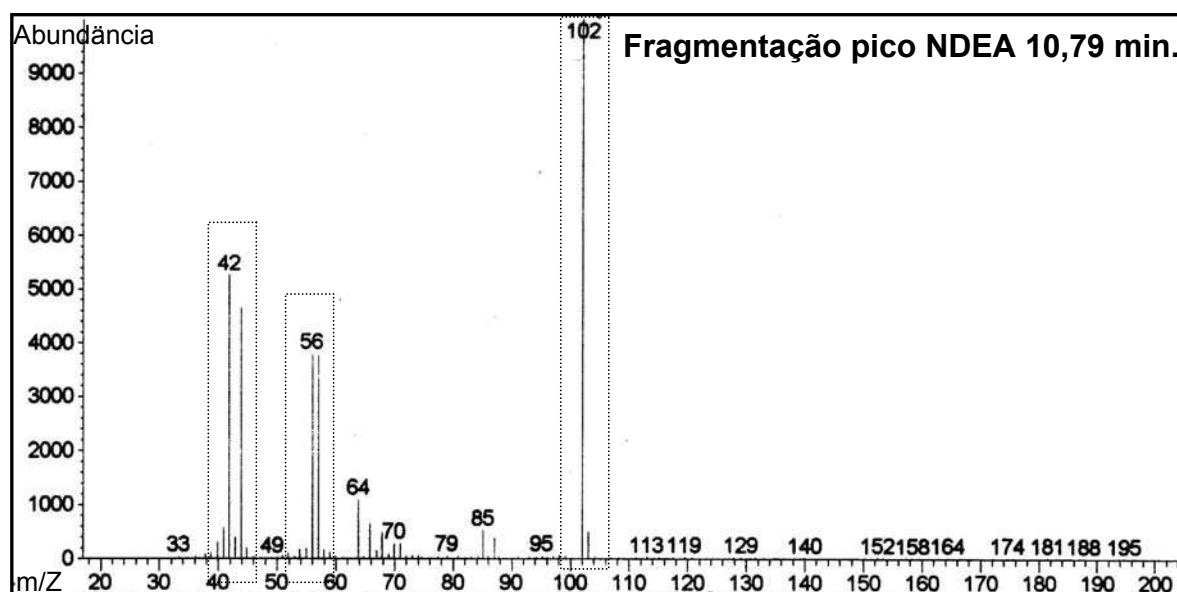


Figura V.5 - Espectro de fragmentação obtido por GC-MS do padrão analítico NDEA (100 ng mL^{-1}). Condições cromatográficas descritas no texto.

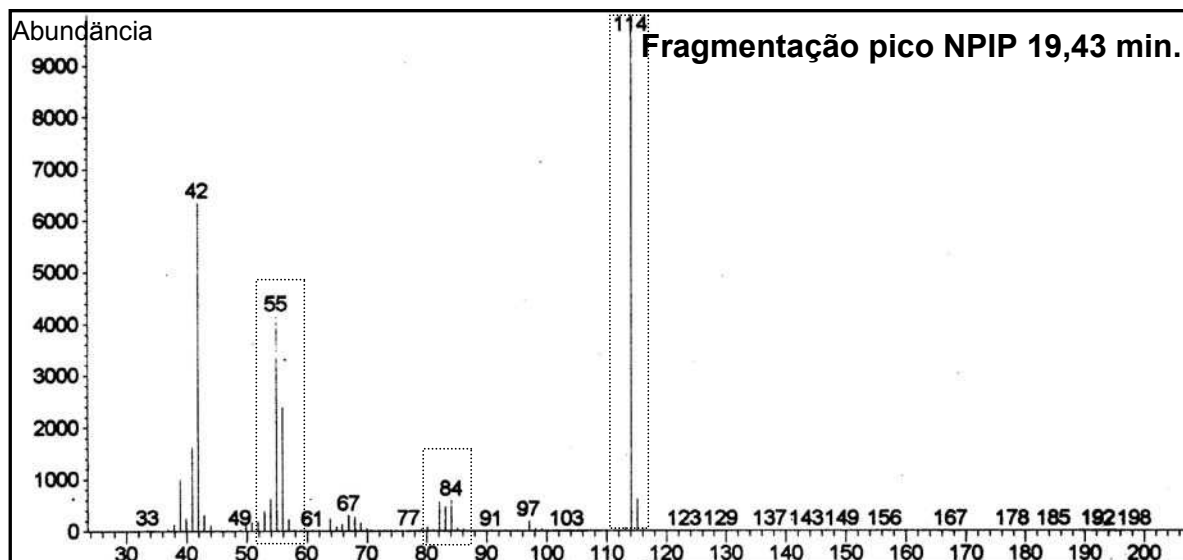


Figura V.6 - Espectro de fragmentação obtido por GC-MS do padrão analítico NPIP (100 ng mL^{-1}). Condições cromatográficas descritas no texto.

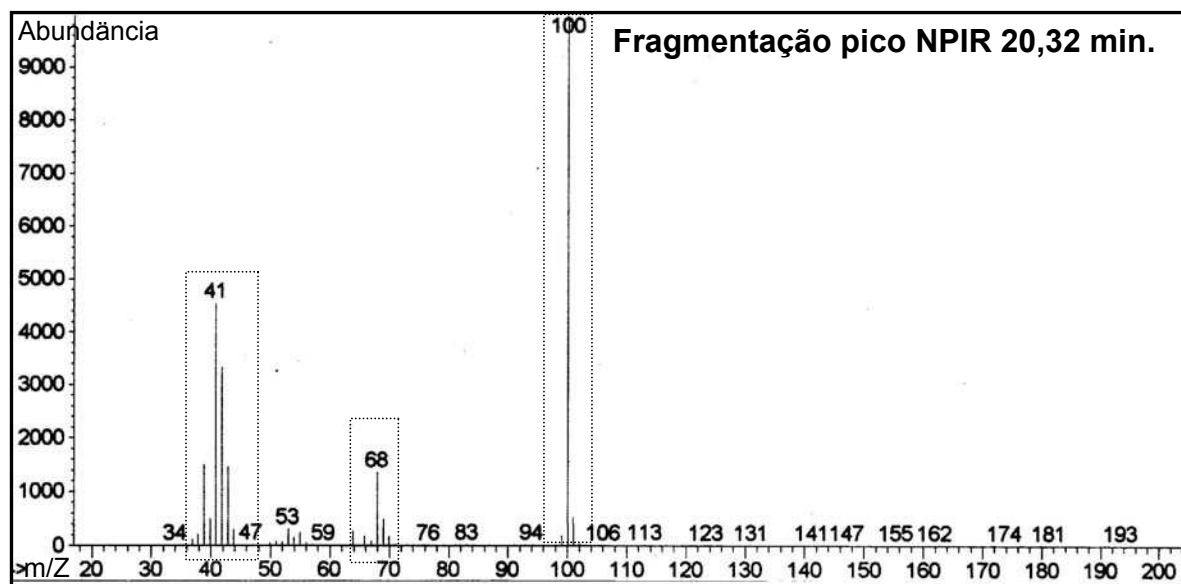


Figura V.7 - Espectro de fragmentação obtido por GC-MS do padrão analítico NPIR (100 ng mL^{-1}). Condições cromatográficas descritas no texto.

Os parâmetros analíticos avaliados na determinação de N-nitrosaminas por GC-MS estão apresentados na Tabela V.4.

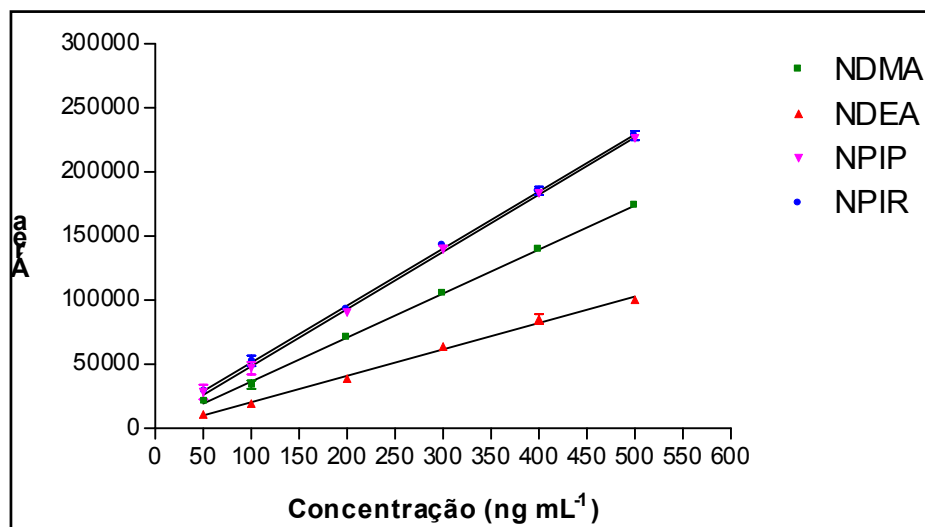


Figura V.8 – Curvas analíticas (GC-MS) para as nitrosaminas: NDMA, NDEA, NPIR e NPIP.

Tabela V.4 - Parâmetros analíticos para a determinação de nitrosaminas por GC-MS.

Parâmetros analíticos	NDMA	NDEA	NPIP	NPIR
Faixa linear (ng mL ⁻¹)	50 a 500	50 a 500	50 a 500	50 a 500
Linearidade	0,9985	0,9932	0,9971	0,9980
Sensibilidade (u.a. mL ng ⁻¹)	344	266	412	386
Repetibilidade (% RSD, n=6) 50 ng mL ⁻¹	12,1	2,06	7,03	1,35
Detectabilidade (pg)*	58	54	58	65

(*) A detectabilidade (D) foi calculada a partir da curva analítica, u.a.: unidades de área.

Verifica-se de acordo com as curvas analíticas obtidas para a NDMA, NDEA, NPIP e NPIR empregando o GC-MS, que as linearidades encontradas foram adequadas, estando todas acima de 0,99.

As estimativas do desvio padrão relativo obtidos (Tabela V.4) não foram superiores a 12,1%, indicando precisão entre as replicatas de injeção. Para níveis de concentração na faixa de 1000 ng mL^{-1} , o esperado é de uma variação máxima de 16% (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC, 2002).

A partir dos dados obtidos verifica-se que a técnica GC-MS, mediante o equipamento empregado, apresenta uma detectabilidade 10 vezes maior do que a técnica GC-TEA, o que irá requerer uma maior pré-concentração dos analitos na etapa de preparo de amostras.

Portanto, cabe destacar, que a técnica GC-MS terá apenas finalidade da confirmação de identidade das N-nitrosaminas e a análise quantitativa será realizada por HS-SPME-GC-TEA por curva de adição padrão.

V.5 - CONCLUSÕES

A GC-TEA, empregando uma coluna megabore HP-INOWAX (30 m x $530 \mu\text{m}$, d.i. $1 \mu\text{m}$) e um gradiente de temperatura de 100°C (3 min), 40°C/min 140°C , 5°C/min até 160°C , mostrou ser adequada para a separação e quantificação da nitrosodimetilamina, nitrosodietilamina, nitrosopiperidina e nitrosopirrolidina.

Tanto a cromatografia gasosa com detetor TEA como o MS apresentam uma detectabilidade das nitrosaminas na ordem de pg, o que representa sensibilidade adequada para a determinação de nitrosaminas em produtos cárneos, porém o GC-MS requer uma pré-concentração das nitrosaminas na etapa de preparo de amostras.

CAPÍTULO VI – DETERMINAÇÃO DE N-NITROSAMINAS POR SPE E SPME-GC-TEA

VI.1- INTRODUÇÃO

Após a determinação das condições de separação das N-nitrosaminas por cromatografia gasosa, a próxima etapa do processo de análise é o preparo de amostra.

As técnicas de preparo de amostras têm a finalidade de extrair o analito da matriz, livrando-o de compostos que interfiram na análise, concentrando-o a uma escala possível de ser analisada e tornando a matriz compatível com o método analítico, neste caso o sistema cromatográfico.

Cabe ressaltar que a amostragem e o preparo de amostras são as etapas mais críticas do procedimento analítico, sendo consideradas como maiores fontes de erros, pois requerem maior tempo e maior manipulação da amostra.

O preparo de amostras ideal deve ser baseado num procedimento rápido, com poucas etapas, capaz de produzir recuperações quantitativas e repetitivas do analito e, de preferência, apresentar a possibilidade de mecanização (QUEIROZ *et al.*, 2001).

A escolha do tipo de técnica de preparo de amostra é feita em função das características da matriz, do analito e das condições cromatográficas empregadas.

Em particular, o preparo de amostras de alimentos, visando a determinação de um composto volátil, como as N-nitrosaminas, devem ser avaliadas cuidadosamente, devido a complexidade da matriz, baixa concentração do composto de interesse (geralmente, em níveis de $\mu\text{g kg}^{-1}$), facilidade de perda por volatilização, destruição do composto e formação de artefatos.

O procedimento recomendado pela AOAC para a separação das nitrosaminas voláteis nos alimentos é a destilação a vácuo (AOAC, 1997) e a extração por coluna contendo celite (AOAC, 1997). No entanto, estes métodos apresentam algumas limitações como o elevado consumo de tempo, pequena possibilidade de mecanização, perda do analito durante o processo de concentração

e emprego de solventes.

Com a implantação do programa da Agência de Proteção Ambiental dos EUA, EPA - *Environmental Protection Agency*, que apresenta alternativa visando a redução de solventes tóxicos e eliminação de clorofluorcarbonos (CFC) (U.S. EPA, 1991), percebe-se uma preocupação da comunidade científica no desenvolvimento de técnicas que utilizem pouca quantidade de solvente ou, ainda, de técnicas que dispensem o uso dos mesmos. Assim sendo, técnicas alternativas como a extração em fase-sólida (SPE) (PENSABENE *et al.*, 1992; TAKATSUKI e KIKUCHI, 1990; RAOUL *et al.*, 1997) e, mais recentemente, a microextração em fase sólida (SPME) (SEN, 1997) têm sido recomendadas como procedimentos para o preparo de amostra de N-nitrosaminas voláteis em produtos cárneos e serão avaliadas neste capítulo.

A SPE é uma técnica de preparo de amostra que tem como objetivo a limpeza, concentração e fracionamento da amostra, apresentando grande aplicação nas mais diversas áreas.

A SPME é uma técnica de extração e pré-concentração rápida, simples e que dispensa o uso de solventes extratores e manipulação excessiva de amostra. Esta técnica, foi descrita por ARTHUR e PAWLISZYN, 1990, no início da década de 90 e tem sido extensivamente estudada e aplicada a diversas matrizes como alternativa às metodologias tradicionais (AUGUSTO e VALENTE, 2002).

VI.2- OBJETIVOS

O objetivo geral foi desenvolver e validar um método para a determinação de nitrosaminas voláteis em lingüiças, empregando para tanto a cromatografia gasosa acoplada ao detetor de quimiluminescência (GC-TEA).

Os objetivos específicos foram avaliar diferentes preparos de amostra como a extração em fase sólida e a microextração em fase sólida na determinação de nitrosaminas, bem como aplicar o método na análise de produtos cárneos.

VI.3 - PARTE EXPERIMENTAL

VI.3.1- INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

VI.3.1.1 – CROMATOGRAFIA GASOSA – DETETOR TEA

As análises por GC-TEA foram realizadas em um equipamento Agilent Modelo 6890 (Agilent, EUA), acoplado a um detetor TEA Modelo 610 (Thermo Orion, EUA), operando no modo nitrosaminas. As temperaturas da interface e de pirólise foram ajustadas em 250 °C e 550 °C, respectivamente. A coluna usada foi megabore HP-INOWAX (100% polietilenoglicol), 30 m x 530 µm, di.1 µm (Agilent, EUA). Foram realizadas injeções de 2 µL no modo *splitless*. A temperatura do injetor foi de 200 °C e como gás de arraste foi usado hélio a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. A temperatura do forno seguiu a seguinte programação: 100 °C (5 min), 20 °C/min até 160 °C (3 min).

VI.3.1.2– CROMATOGRAFIA GASOSA – DETETOR MS

As análises por GC-MS foram realizadas em um instrumento HP 5890 serie II acoplado ao detetor de massas HP 5971 (Hewlett Packard, EUA) e injetor automático HP 7673. A coluna capilar usada foi CP-WAX (100% polietilenoglicol), 30 m x 250 μm , di. 0,25 μm (Varian, EUA).

As injeções foram realizadas automaticamente (1 μL) no modo *splitless* com o injetor a 250 °C. A vazão do gás de arraste (hélio) foi de 1 mL min^{-1} .

Para a quantificação das nitrosaminas, o detetor de massas foi utilizado no modo SIM, atribuindo a cada analito o fragmento mais abundante para ser usado como íon de quantificação (IQ) e outros dois íons para identificação (II) (Tabela 5.3), considerando o tempo de eluição de cada analito. Os tempos de retenção e as abundâncias relativas de IQ e II foram utilizados como critério de identificação.

VI.3.2 – EQUIPAMENTOS

Os equipamentos empregados nas etapas de preparo de amostra foram:

- Sistema à vácuo para extração em fase sólida (Alltech, EUA) com capacidade para 12 cartuchos;
- Banho de recirculação de água Modelo 9000 (PolyScience, EUA);
- Liquidificador Modelo 33BL79 (Waring Commercial, EUA);
- Banho de ultra-som USC 700 (Unique Thorton, Brasil);
- Centrífuga Modelo 204-NR (Fanem, Brasil);
- Chapa de aquecimento e agitação (Fisatom, Brasil).

VI. 3.3 – MATERIAL PARA SPE

Para a extração em fase sólida foram usados cartuchos de extração em fase sólida (Alltech, EUA) de:

- Sílica (3 mL, 500 mg);
- Alumina ácida (3 mL, 500 mg);
- Florisil (3 mL, 500 mg).

VI. 3.4 – MATERIAL PARA SPME

Para a microextração em fase sólida foram usados:

- *Holder* para SPME (Supelco, EUA);
- Fibras de Poliacrilato (PA) de 85 μm (Supelco, EUA);
- Fibras de Poldimetilsiloxano–divinilbenzeno (PDMS–DVB) de 65 μm (Supelco, EUA);
- Frascos de vidro com 24 mL de capacidade e boca de 20 mm;
- Septos de teflon/silicone (Pierce, EUA).

VI.3.5 - REAGENTES E PADRÕES

Todos os reagentes utilizados foram de grau p.a. As soluções foram preparadas com água destilada e purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA).

Os padrões analíticos foram todos da Sigma-Aldrich: N-Nitrosodimetilamina (99,99 %), N-nitrosodietilamina (99,99 %), N-nitrosopiperidina (99,99 %), N-nitrosopirrolidina (99,99 %) e N-nitrosopropilbutilamina (99,99 %).

VI.3.6 - PREPARO DE SOLUÇÕES

Preparo da curva analítica para as nitrosaminas na faixa de concentração de 5 a 60 ng mL⁻¹

As soluções estoque de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR foram preparadas à partir da diluição de 10 µL dos padrões analíticos em metanol em balão volumétrico de 10 mL para uma concentração final de 1000 µg mL⁻¹. As soluções de trabalho 100 µg mL⁻¹ foram preparadas diariamente à partir da diluição com metanol de 1 mL da solução estoque de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR 1000 µg mL⁻¹ em balão volumétrico de 10 mL.

Aos balões volumétricos de 10 mL foram adicionadas alíquotas de 50; 100; 200; 300; 400; 500 e 600 µL da solução trabalho de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR 1,00 µg mL⁻¹ e 300 µL da solução trabalho de NPBA 100 µg mL⁻¹, sendo o volume completado com metanol. Foram obtidas, desta forma, soluções de trabalho de concentrações 5,00, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0, 50,0 e 60,0 ng mL⁻¹ de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR, utilizadas na construção da curva analítica tendo a NPBA como padrão interno.

VI.3.7 - AMOSTRAS

As amostras analisadas de lingüiças tipo frescal, foram adquiridas no comércio de Campinas, SP, no período de 2002 a 2003.

VI.3.8 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

VI.3.8.1- PREPARO DE AMOSTRAS

Para a determinação das nitrosaminas, 500 g das amostras de lingüiças foram previamente submetidas à fritura em óleo de soja da marca Liza por 3 min, resfriadas à temperatura ambiente e trituradas com gelo seco em liquidificador de aço inox (Waring Commercial, EUA).

VI.3.8.2 – PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

O procedimento experimental para a extração das nitrosaminas da matriz alimentícia foi baseado nos trabalhos de TAKATSUKI e KIKUCHI, 1990; RAOUL *et al.*, 1997 e SEN *et. al.*, 2000).

Para o preparo de amostra empregando SPE foram avaliados cartuchos contendo alumina A, florisil ou sílica.

A otimização da técnica de SPE foi realizada mediante a análise de amostras fortificadas juntamente com seu branco, a fim de avaliar a taxa de recuperação.

As fortificações foram realizadas através da adição de 250 µL de uma solução padrão contendo NDMA, NDEA, NPIP E NPIR na concentração de 1000 µg L⁻¹ sobre 2,5 g de amostras de lingüiças, preparadas conforme descrito em VI.3.8.1.

VI.3.8.2.1 – ANÁLISE DE AMOSTRAS UTILIZANDO SPE

O procedimento de extração das nitrosaminas por SPE em amostras de lingüiças foi dividido em duas etapas: (i) extração das nitrosaminas da matriz e (ii) limpeza do extrato no cartucho SPE.

Para tanto, uma porção de 2,5 g da amostra de lingüiça já preparada, foi transferida para um almofariz, triturada com 1,5 g de Na_2SO_4 e levadas ao ultra-som por 5 minutos para homogeneização. Em seguida, a amostra foi transferida para um tubo de centrífuga com 5 mL de diclorometano e centrifugada por 10 minutos. Foi então, realizada a filtração do extrato em papel de filtro quantitativo e adicionado mais 5 mL de diclorometano. O extrato foi novamente centrifugado por 10 minutos e filtrado. Ao extrato foram adicionados 5 mL de hexano, e este levado à evaporação do diclorometano em tubos de Kuderna-Danish, em banho-maria à 50 °C até o volume final de 5 mL. Todos os estudos foram realizados em duplicata.

Os cartuchos foram adaptados no sistema à vácuo e condicionados com 3 mL de hexano. Em seguida, o extrato (cerca de 5 mL) foi adicionado ao cartucho e o mesmo foi lavado com 1 mL de hexano para remoção dos interferentes. Em seguida a fase foi seca mediante passagem de ar e imeditamente foi realizada a eluição das nitrosaminas com a passagem de 5 mL de diclorometano:metanol (95:5 v/v).

Os eluatos obtidos na SPE foram injetados diretamente no GC –TEA, operando nas condições otimizadas conforme descrito no capítulo V, item V.3.1.1.(pág. 90).

A quantificação foi avaliada por padronização interna, tendo a NPBA como padrão interno, conforme procedimento descrito em V.3.6.

VI.3.8.3 – OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SPME-GC-TEA

Os estudos para otimização das condições de SPME na determinação das nitrosaminas foram realizados para duas fibras: polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) e uma fibra de poliacrilato (PA). As fibras foram condicionadas antes da realização dos experimentos conforme instruções do fabricante. A fibra PDMS-DVB foi condicionada por 3 horas à temperatura de 210 °C e a de PA por 3 horas à temperatura de 300 °C.

A otimização das condições de operação da SPME foi feita através de um planejamento experimental conforme descrito em VI.3.8.3.1.

Para a realização dos ensaios foram utilizados frascos herméticos de capacidade de 24 mL, os quais foram fechados com septos de teflon/silicone. O volume da amostra foi fixado em 12 mL.

Os frascos fechados foram imersos em banho termostático, a amostra agitada por intermédio de uma barra magnética (1 cm x 0,5 cm) à 1200 rpm e após um tempo de equilíbrio a fibra foi exposta no headspace por um tempo previsto no planejamento. Após o tempo de extração, a fibra foi introduzida no injetor do cromatógrafo, para a dessorção térmica dos analitos, a uma temperatura de 200 °C, durante 8 min. As condições experimentais foram estabelecidas mediante planejamento experimental (VI.3.8.3.1) e as condições cromatográficas empregadas foram as mesmas descritas no capítulo V, item VI.3.1.1.

O sistema empregado para os ensaios usando a SPME está apresentado na Figura VI.1.



Figura VI.1 – Foto do sistema empregado para a microextração em fase sólida. Do lado esquerdo aparece o banho de recirculação de água (1) acoplado num pequeno reator encamisado (2) e do lado direito o frasco dentro do banho do reator com a fibra inserida e sob uma placa de agitação magnética.

VI.3.8.3.1 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizados estudos preliminares para estabelecer os intervalos entre os níveis para a realização do planejamento experimental. Inicialmente foi empregada como amostra uma solução padrão aquosa contendo uma mistura das quatro nitrosaminas sob estudo na concentração de $50,0 \text{ ng mL}^{-1}$. As variáveis avaliadas foram: tempo de equilíbrio, tempo de extração, temperatura e força iônica, conforme Tabela VI. 1.

Tabela VI.1 - Parâmetros experimentais estudados para se determinar o intervalo entre os níveis.

Parâmetros	Faixa estudada
Tempo de equilíbrio (min)	5 a 20
Tempo de extração (min)	5 a 45
Temperatura (°C)	25 a 60
Adição de Sal (% NaCl)	0 a 36

Após estabelecer o intervalo entre os níveis foi montado o planejamento experimental. No entanto, para esse planejamento foi empregado, em vez da solução padrão aquosa contendo as nitrosaminas, uma suspensão das lingüiças fortificadas com NDMA, NDEA, NPIP e NPIR. Para tanto, cerca de 2,5 g da amostra de lingüiça fortificada com 3,6 mL de uma solução padrão aquosa das nitrosaminas $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, previamente triturada e homogeneizada foi introduzida no frasco de 24 mL e adicionada de água até um volume final de 12 mL.

Para distinguir os parâmetros que afetam a eficiência da SPME na análise, foi realizado um planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}). Com os resultados obtidos, uma variável foi mantida constante e outro planejamento 2^3 foi realizado com o ponto central realizado em triplicata e codificado como 0. Este planejamento foi avaliado, considerando os fatores tempo de equilíbrio, tempo e temperatura de extração de acordo com a Tabela VI.2.

Tabela VI.2- Codificação dos fatores

Níveis	Tempo de equilíbrio (min)	Temperatura (°C)	Tempo de extração (min)
-1,41	-	24	4
-1	5	30	10
0	17,5	45	25
+1	30	60	40
+1,41	-	66	46

Os resultados deste planejamento forneceram subsídios para realizar um planejamento experimental do tipo fatorial completo 2^2 com triplicata do ponto central, utilizando como variáveis o tempo de extração e a temperatura de extração (Tabela VI.3).

Tabela VI.3 – Ensaios do planejamento experimental para otimização das condições operacionais da fibra de PDMS-DVB na extração de N-nitrosaminas.

Variáveis	Níveis				
	(-1,4)	(-1)	(0)	(+1)	(+1,4)
(X₁) Temperatura de extração (°C)	24	30	45	60	66
(X₂) Tempo de extração (min)	4	10	25	40	46
Ensaio	X ₁		X ₂		
01	30		10		
02	60		10		
03	30		40		
04	60		40		
05	66		25		
06	24		25		
07	45		46		
08	45		4		
09	45		25		
10	45		25		
11	45		25		

A resposta dos ensaios foi avaliada em termos da massa recuperada das nitrosaminas através da determinação destes por GC-TEA (condições descritas em V.3.1.1). A relação entre a resposta do detetor em função da massa de cada nitrosamina foi previamente estabelecida, através da injeção direta de soluções padrão de nitrosaminas no intervalo de 10 a 120 pg.

Os dados estatísticos foram processados pelo programa Statistica (Statsoft Inc., EUA) v. 5.5.

VI.3.8.5 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO HS-SPME-GC-TEA

O método proposto foi validado por avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, recuperação, repetibilidade, limite de detecção e limite de quantificação. A exatidão do método foi avaliada mediante teste de recuperação.

Os parâmetros de validação foram avaliados da seguinte forma:

Faixa linear: foram construídas curvas analíticas no intervalo de 60 a 720 ng pelo método de adição padrão para a NDMA, NDEA, NPIP e NPIR.

Linearidade (r): calculadas a partir da regressão linear de três curvas analíticas pelo método de adição padrão para a NDMA, NDEA, NPIP e NPIR no intervalo de concentração de 60 a 720 ng.

Sensibilidade: Calculada a partir do coeficiente angular médio das curvas analíticas obtidas para as nitrosaminas em estudo.

Recuperação: Foi avaliada por curva de adição padrão para a NDMA, NDEA, NPIP e NPIR no intervalo de concentração de 60 a 720 ng.

Repetibilidade (Precisão intra-ensaio): Foi avaliada pela realização de seis análises sucessivas de uma amostra fortificada (2,50 g) em 360 ng de cada nitrosamina em estudo.

Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ): Foram determinados pela razão do sinal-ruído de 3 e 10, respectivamente, medidos nas proximidades do tempo de retenção dos analitos correspondentes.

VI.3.8.6 - ANÁLISE DE AMOSTRAS POR HS-SPME-GC-TEA

As amostras de lingüiças, previamente fritas (VI.3.8.1), foram trituradas com gelo seco e homogeneizadas em liquidificador. Uma massa de 2,50 g foi introduzida no frasco de capacidade de 24 mL contendo uma barra magnética (1 cm x 0,5 cm) adicionando-se água até um volume final de 12 mL. Os frascos foram lacrados com septos de teflon/silicone e imersos em um banho termostatizado a 45 °C. Após um tempo de 10 min, sob agitação constante, a fibra de PDMS-DVB foi exposta no headspace por um tempo de 25 min. Após o tempo de extração, a fibra foi inserida no injetor do cromatógrafo à gás para a dessorção térmica dos analitos, a uma temperatura de 200 °C, durante 8 min, operando nas condições descritas em VI.3.1.1. Após análise da amostra, mais três porções de 2,50 g da amostra foram fortificadas com 120 ng, 360 ng e 600 ng e a determinação realizada segundo procedimento descrito acima.

VI.4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI.4.1- AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRAS

Uma vez que os produtos cárneos e, em particular, a lingüiça é uma matriz complexa, contendo entre outros lipídeos, sais e proteínas, é necessário o emprego de etapas prévias de preparo de amostras anterior a determinação das nitrosaminas por GC-TEA. A determinação de analitos em concentrações ao nível de traços (análise de resíduos) requer um preparo de amostra que permita a pré-concentração do analito e resulte em um extrato livre de interferentes. Neste sentido foram avaliadas as técnicas de SPME e SPE.

VI.4.1.1 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Na extração em fase sólida (SPE) foram utilizados cartuchos contendo sílica, alumina A e florisil, sendo que os procedimentos empregados foram baseados na literatura (TAKATSUKI e KIKUCHI, 1990; RAOUL *et al.*, 1997; SEN *et al.*, 2000). Inicialmente foram empregadas soluções padrão de nitrosaminas ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) preparadas em hexano para avaliar a afinidade de cada nitrosamina com a fase estacionária do cartucho. Para a etapa de eluição foram avaliados diferentes solventes conforme apresentado na Tabelas VI.4., VI.5. e VI.6.

Tabela VI.4 - Teste de recuperação avaliando diferentes solventes na eluição da NDMA, NDEA, NPIP E NPIR ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) do cartucho de sílica.

Solventes	Recuperação (%) (n=2)			
	NDMA	NDEA	NPIP	NPIR
EDT:MeOH (2:1 v/v)	n.d.	n.d	109	50
DCM: EDT (7:3 v/v)	40	44	58	70
DCM:MeOH (95:5 v/v)	47	64	65	68

EDT- Éter dietílico, MeOH- Metanol, DCM- Diclorometano.

n.d: não detectada

Tabela VI.5- Teste de recuperação avaliando diferentes solventes na eluição da NDMA, NDEA, NPIP E NPIR ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) do cartucho de Florisil.

Solventes	Recuperação (%) (n=2)			
	NDMA	NDEA	NPIP	NPIR
HXN:DCM (3:1 v/v)	17	26	58	39
DCM:EDT (7:3 v/v)	59	86	67	66
DCM:MeOH (95:5 v/v)	96	99	102	108

EDT- Éter dietílico, MeOH- Metanol, DCM- Diclorometano, HXN- Hexano

Tabela VI.6.: Teste de recuperação avaliando diferentes solventes na eluição da NDMA, NDEA, NPIP E NPIR ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) do cartucho de Alumina-A.

Solventes	Recuperação (%) (n=2)			
	NDMA	NDEA	NPIP	NPIR
EDT:MeOH (2:1 v/v)	14	18	100	83
DCM:EDT (7:3 v/v)	47	64	65	68
DCM:MeOH (95:5 v/v)	49	64	65	65

EDT- Éter dietílico, MeOH- Metanol, DCM- Diclorometano.

Os resultados obtidos indicam que as quatro nitrosaminas sob estudo não se comportam de forma similar em todos os cartuchos. De modo geral, as nitrosaminas de cadeia alifática apresentaram valores menores de recuperação nos cartuchos de sílica e alumina-A. Ainda, foi verificado (Tabelas VI.5) que a fase florisil é a mais adequada para a extração e pré-concentração das nitrosaminas sob estudo, tendo em vista a maior recuperação. A melhor composição do solvente de eluição é uma mistura de diclorometano e metanol na proporção 95:5 v/v. Com essas condições experimentais foi obtida, para todas as nitrosaminas na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, uma recuperação no intervalo de 96 a 108 %. Esses resultados estão de acordo com os valores de recuperação aceitáveis para a análise de resíduos, de 70 a 120% (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC, 2002).

O cartucho contendo a fase florisil, foi utilizado no clean'up, após a extração das nitrosaminas de amostras de lingüiça fortificadas (5, 10 e $50 \mu\text{g L}^{-1}$) para avaliar o efeito matriz. A recuperação média das nitrosaminas variou de 49 a 84 % (Tabela VI.7), sendo que a NDEA apresentou a menor recuperação.

Tabela VI.7 - Recuperação média das nitrosaminas em amostras de lingüiça fortificadas em três níveis. Extração por SPE em cartucho contendo florisil.

NITROSAMINAS	Recuperação média (%) (n=2)	Desvio médio % (n=2)
NDMA	69	5
NDEA	49	1
NPIP	56	3
NPIR	84	4

Os baixos valores de recuperação das amostras fortificadas em relação a recuperação obtida com solução padrão se deve a complexidade da amostra, que possivelmente acarreta perda das nitrosaminas.

A Figura VI.2 apresenta o cromatograma da amostra de linguiça fortificada com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ das N-nitrosaminas extraídas por SPE em cartucho florisil.

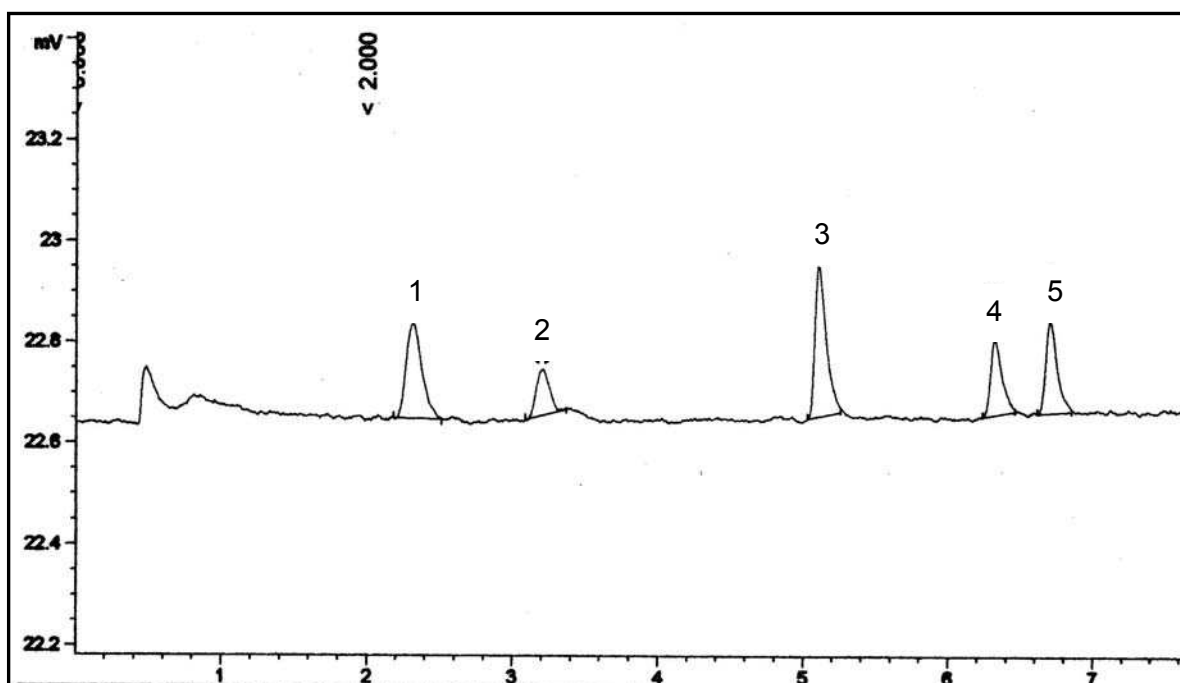


Figura VI.2 – Cromatograma obtido por GC-TEA de uma amostra de linguiça fortificada com 50 ng mL^{-1} de 1-NDMA ($t_R = 2,3 \text{ min.}$); 2-NDEA ($t_R = 3,2 \text{ min.}$); 3-NPBA ($t_R = 5,1 \text{ min.}$); 4-NPIP ($t_R = 6,3 \text{ min.}$) e 5-NPIR ($t_R = 6,7 \text{ min.}$) e extraídas por SPE. Condições cromatográficas descritas no item V.3.1.1, pág. 90.

VI.4.1.2 - MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A eficiência de extração na SPME depende de parâmetros como temperatura, tempo de equilíbrio, força iônica e tempo de exposição da fibra. Quanto ao modo de amostragem, esta pode ser realizada no espaço confinante (HS) ou por imersão direta. Tendo em vista a complexidade da matriz e a volatilidade das nitrosaminas, a amostragem foi realizada no HS. A dessorção do analito é realizada termicamente no injetor do GC-TEA.

Para avaliar a eficiência da extração das nitrosaminas duas fibras de polaridades distintas foram empregadas: PDMS-DVB e PA. O procedimento usado está descrito no item VI.3.8.3.

Inicialmente foram estabelecidas as condições experimentais ótimas para a extração de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR, mediante avaliação do tempo de equilíbrio (t_{eq}), tempo (t_{ex}) e temperatura (T) de extração e força iônica (I). As condições ótimas estabelecidas foram para a fibra PDMS-DVB (t_{eq} : 10 min; I: 36 % m/v NaCl; T: 30 °C e t_{ex} : 30 min) e PA (t_{eq} : 10 min; I: 36 % w/v NaCl; T: 50 °C e t_{ex} : 20 min) (Figura VI. 3).

A fibra PDMS-DVB apresentou melhor recuperação para a extração de NDMA e NDEA em comparação com a fibra PA que apresentou alta eficiência para a NPIP e NPIR. A fibra PDMS-DVB apresenta polaridade intermediária e é sensível a aminas (ALPENDURADA, 2000). A fibra polar PA demonstra ser mais eficiente na extração das nitrosaminas mais polares NPIP e NPIR. Pelo fato da NDMA e NDEA serem mais comumente encontradas em lingüiças e a fibra PDMS-DVB ter apresentado melhor eficiência de extração em comparação a PA para esses compostos, a fibra com recobrimento PDMS-DVB foi empregada para os estudos realizados na matriz alimento.

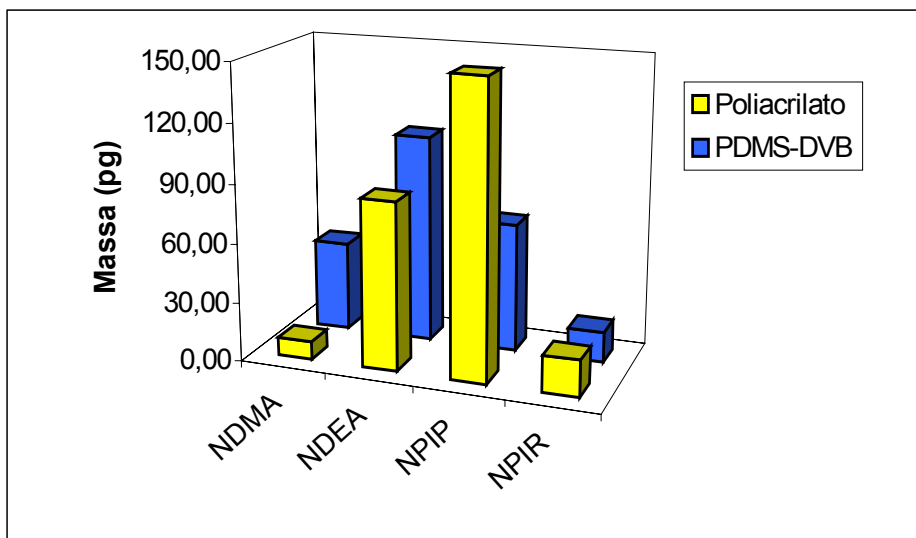


Figura VI. 3 - Comparação da fibra PDMS-DVB e PA na extração de nitrosaminas. Condições: 30 ng mL⁻¹ de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR. PDMS-DVB (t_{eq} : 10 min; I: 36 % m/v NaCl; T: 30 °C e t_{ex} : 30 min) e PA (t_{eq} : 10 min; I: 36 % w/v NaCl; T: 50 °C e t_{ex} : 20 min).

Avaliou-se a possibilidade do emprego da NPBA como padrão interno, no entanto, apesar da separação adequada quanto as demais nitrosaminas, a fibra apresentou afinidade 1000 vezes maior para a NPBA que para as demais nitrosaminas em uma mesma concentração. Devido a baixa repetibilidade dos resultados, esse composto não se mostrou adequado para a padronização interna.

VI.4.1.2.1- PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para montar o planejamento fatorial para otimização dos principais parâmetros experimentais na SPME foi necessário realizar experimentos preliminares para a escolha das variáveis independentes, consideradas as mais importantes nas respostas obtidas pela extração por SPME.

Após os resultados dos testes preliminares apresentados nos gráficos das Figuras VI. 4 a VI.7, ficou estabelecido o intervalo entre os níveis conforme a Tabela VI.2. O tempo de equilíbrio praticamente não apresentou variação no intervalo de 5 a 20 minutos, porém foi também avaliado pelo planejamento uma vez que este seria realizado com suspensão de lingüiça.

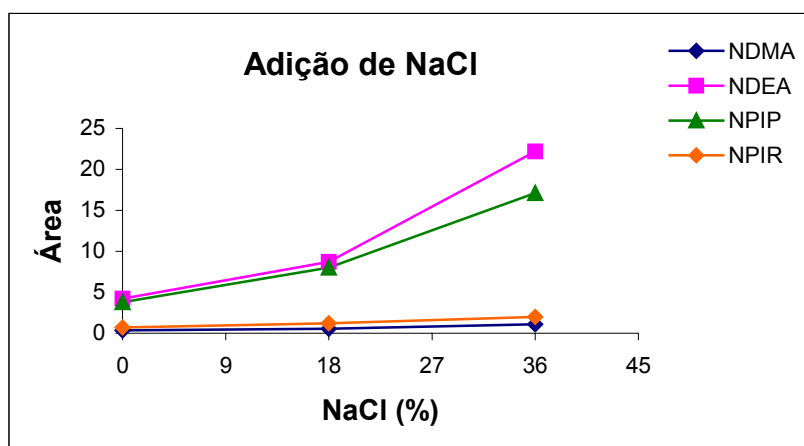


Figura VI.4 – Influência da adição de sal na extração das nitrosaminas por HS-SPME, empregando a fibra PDMS-DVB. Concentração das nitrosaminas: 50 ng mL⁻¹.

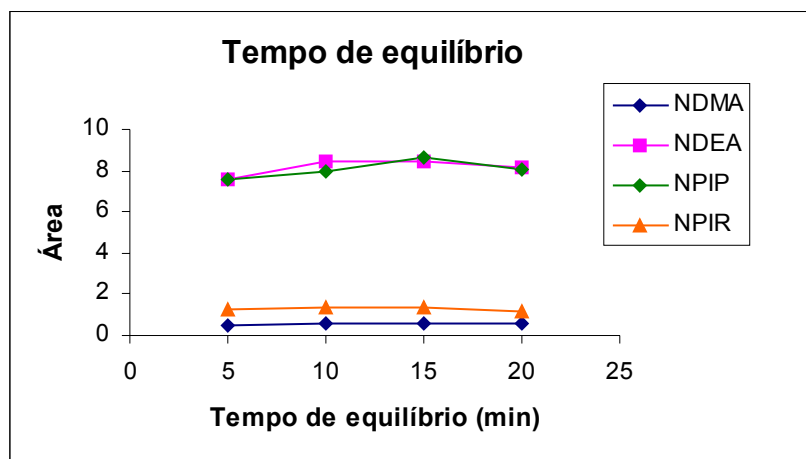


Figura VI.5 - Influência do tempo de equilíbrio na extração das nitrosaminas por HS-SPME, empregando a fibra PDMS-DVB. Concentração das nitrosaminas: 50 ng mL⁻¹.

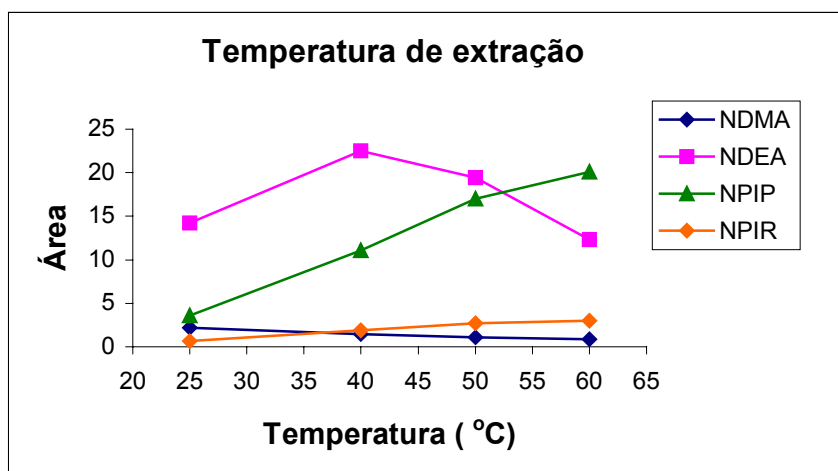


Figura VI.6 - Influência da temperatura na extração das nitrosaminas por HS-SPME, empregando a fibra PDMS-DVB. Concentração das nitrosaminas: 50 ng mL⁻¹.

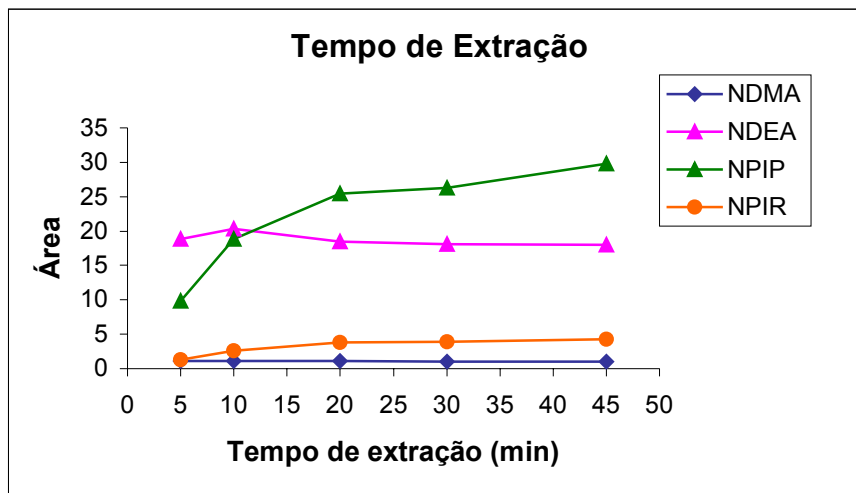


Figura VI.7 - Influência do tempo de extração das nitrosaminas por HS-SPME, empregando a fibra PDMS-DVB. Concentração das nitrosaminas: 50 ng mL⁻¹.

Em estudo preliminar foi verificado que a eficiência de extração das nitrosaminas depende da matriz, sendo que ocorre uma perda significativa (aproximadamente 99 %) da mesma quando se realiza a extração em água ou com a matriz do produto cárneo. Isso é devido a complexidade da matriz alimentícia, que no caso da lingüiça é composta de proteínas, carboidratos, lipídeos, entre outros. Sendo assim, além da partição água/headspace e partição e/ou adsorção headspace/fibra, tem-se um equilíbrio a mais envolvido, a partição das nitrosaminas da matriz lipídica para a água. Portanto, as melhores condições experimentais estabelecidas para extração das N-nitrosaminas por HS-SPME em solução aquosa, não necessitam ser as mais adequadas para a extração das N-nitrosaminas presentes nas lingüiças. Assim, foi avaliada, por um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com dois níveis (-1 e +1), a influência dos diferentes fatores que afetam o processo de extração tais como: força iônica, tempo de equilíbrio, tempo e temperatura de extração, utilizando para tanto uma suspensão de

lingüiça fortificada ao invés de solução aquosa contendo as N-nitrosaminas. Este planejamento resultou em 8 experimentos, tendo sido verificado que o ajuste da força iônica não é importante quando estudado na matriz, uma vez que a amostra já contém sal. Portanto, outro planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central, realizado em triplicata e codificado como 0 (ponto em triplicata), foi avaliado considerando os fatores tempo de equilíbrio, tempo e temperatura de extração (Tabela VI.2, pág. 120).

O resultado deste experimento demonstrou que o equilíbrio, entre a fase líquida e a fase vapor (headspace), foi atingido após 5 minutos. Portanto, para eliminar variações quanto ao tempo de equilíbrio, os estudos subsequentes foram realizados com um tempo de 10 minutos antes da exposição da fibra no frasco de HS.

No sentido de refinar os dois fatores de maior importância na determinação de N-nitrosaminas por SPME (tempo e temperatura de extração) foi realizado um novo planejamento experimental. O planejamento foi construído como fatorial completo 2^2 com três pontos centrais (0) e quatro pontos axiais (–1,41 e +1,41) de acordo com a Tabela VI.3 (pág. 121). Os pontos axiais asseguram a condição de rotabilidade do planejamento. As superfícies de resposta obtidas para as quatro nitrosaminas estão apresentadas nas Figuras VI.8 a VI.11.

Foram verificados dois perfis diferentes de superfícies de respostas para as nitrosaminas alicíclicas e cíclicas. As Figuras VI.8. e VI.9. indicam que a amostragem à 45 °C por um tempo de 20 minutos produz uma melhor recuperação de NDMA e NDEA, na matriz lingüiça. Porém, a NPIP e NPIR apresentaram diferentes comportamentos; o tempo de extração ótimo foi, aproximadamente, 10 minutos para ambas nitrosaminas e as temperaturas que resultaram em maior recuperação foram 50 °C e 30 °C, para NPIP e NPIR, respectivamente (Figuras VI.10. e VI.11.). Considerando que em amostras de lingüiças as N-nitrosaminas mais comumente encontradas são a NDMA e NDEA,

as condições ótimas estabelecidas para extração das N-nitrosaminas por HS-SPME são: t_{eq} : 10 min; l: não ajustada; T: 45 °C e t_{ex} : 25 min (Tabela VI.8).

Tabela VI.8. Parâmetros ótimos de extração por HS-SPME-GC-TEA para cada nitrosamina.

Nitrosaminas	Adição de Sal (% m/v NaCl)	Tempo de equilíbrio (min)	Temperatura (°C)	Tempo de extração (min)
NDMA	0	10	45	20
NDEA	0	10	45	20
NPIP	0	10	50	10
NPIR	0	10	30	10

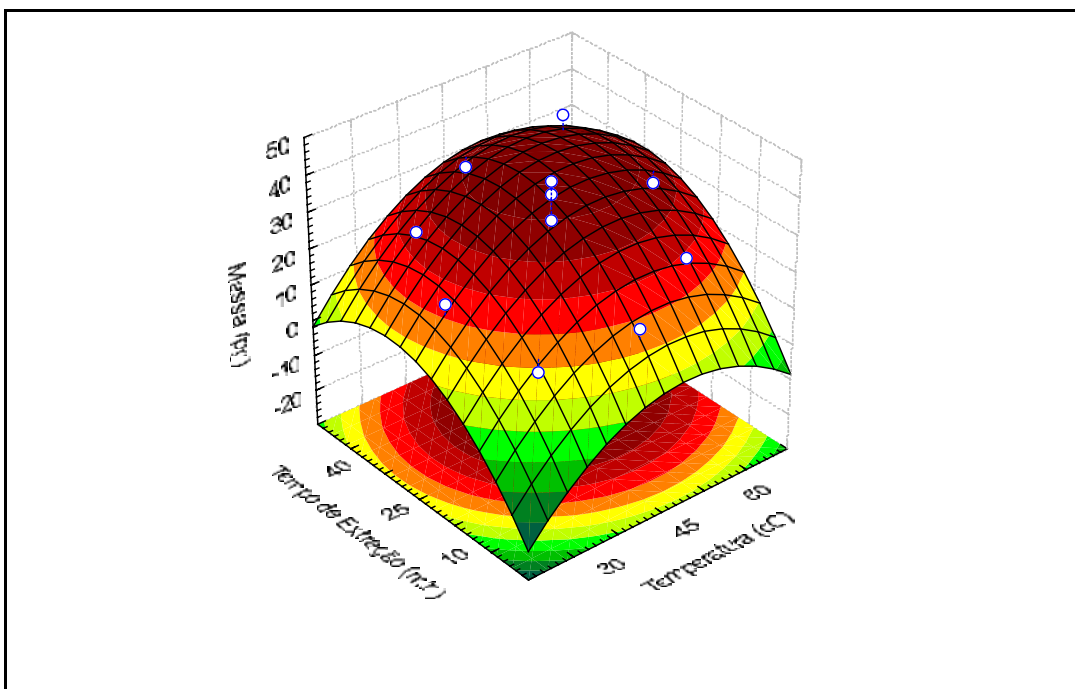


Figura VI.8 - Superfície de resposta para NDMA obtida no planejamento fatorial completo 2^2 . Massa de NDMA x tempo de extração x temperatura.

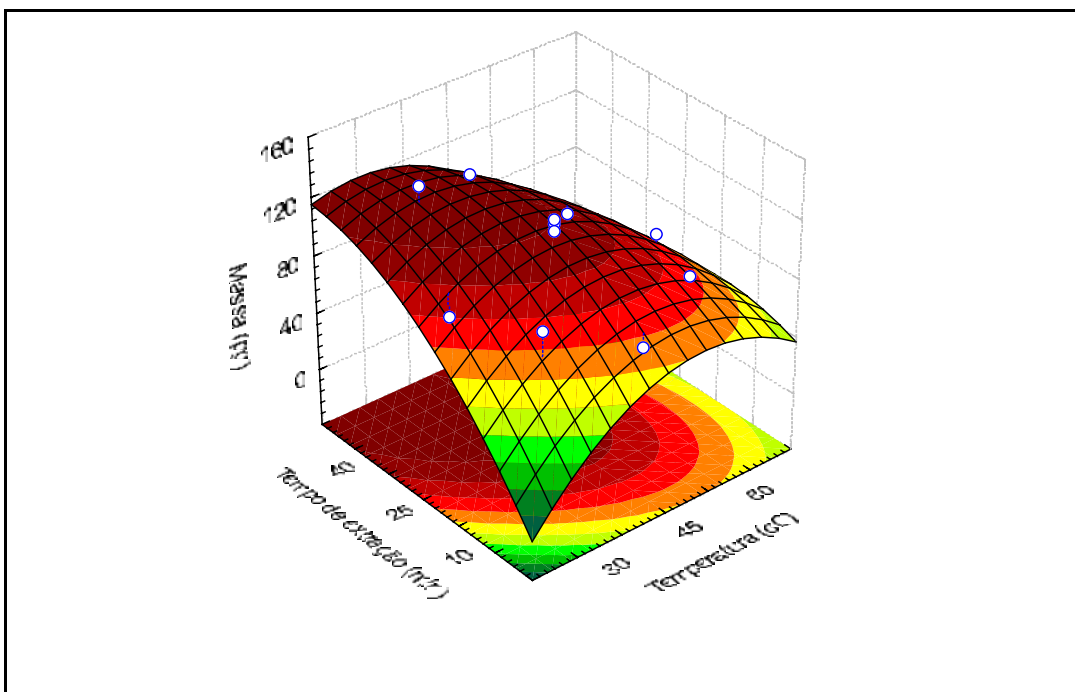


Figura VI.9 - Superfície de resposta para NDEA obtida no planejamento fatorial completo 2^2 . Massa de NDEA x tempo de extração x temperatura.

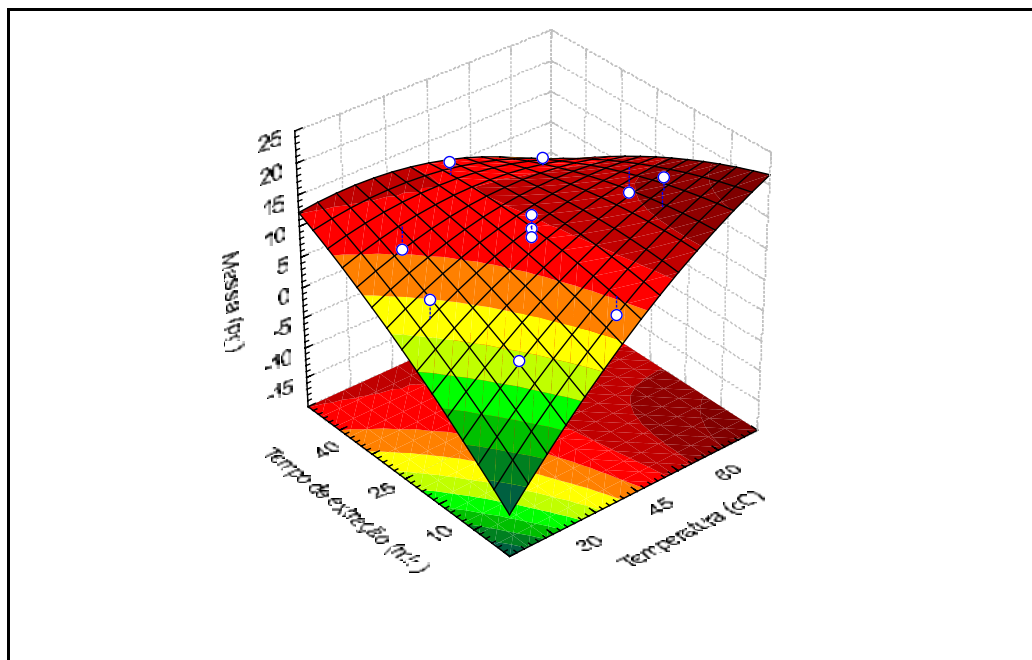


Figura VI.10 - Superfície de resposta para NPIP obtida no planejamento fatorial completo 2^2 . Massa de NPIP x tempo de extração x temperatura.

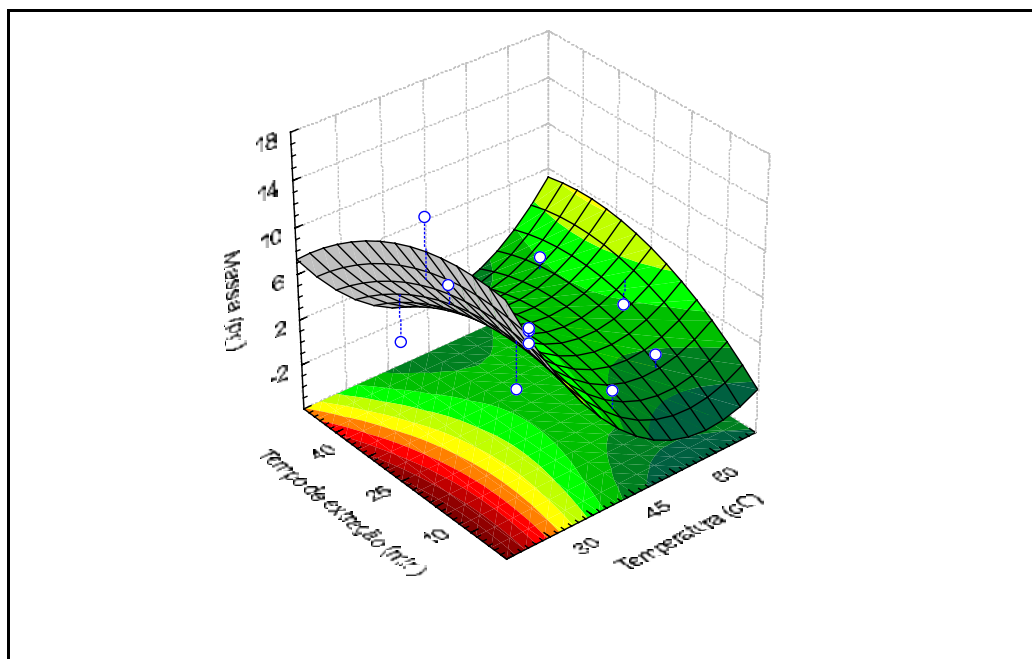


Figura VI.11 - Superfície de resposta para NPIR obtida no planejamento fatorial completo 2^2 . Massa de NPIR x tempo de extração x temperatura.

A eficiência de extração empregando a fibra PDMS-DVB 65 μm e fazendo a amostragem no headspace, em relação a solução aquosa (injeção direta) é menor que 1 % para todas as nitrosaminas em questão, o que pode ser visualizado pela diminuição da sensibilidade obtida através das curvas analíticas para cada modo de análise (Tabela VI.9).

Esses baixos valores de eficiência de extração são decorrentes da baixa transferência das nitrosaminas da solução aquosa para o headspace. No caso da matriz alimentícia essa transferência da solução é menor ainda, uma vez que existe um novo equilíbrio envolvido: matriz lipídica-água e água-headspace. No entanto, quando se compara a quantidade de massa presente no headspace (temperatura de 45 $^{\circ}\text{C}$) em relação a fibra verifica-se uma pré-concentração dos analitos na mesma, sendo que a afinidade dos compostos pela fibra PDMS-DVB segue a ordem: NDEA $\approx$ NPIP $>$ NDMA $\approx$ NPIR (Tabela VI.9). Cabe destacar, que o detetor TEA não apresenta a mesma sensibilidade para todas as nitrosaminas, sendo NDMA $>$ NPIR $>$ NPIP $\approx$ NDEA.

Tabela VI.9 – Sensibilidade para diferentes modos de análise.

Nitrosamina	SENSIBILIDADE* u.a. ng ⁻¹				
	P.e. ^o C/ mm Hg)	Injeção direta	Injeção do headspace**	HS-SPME- GC-TEA (matriz água)***	HS-SPME- GC-TEA (matriz linguiça)****
NDMA	154/760	29,0	0,0401	0,42	1,60 10 ⁻³
NDEA	176/760	17,2	0,0372	7,80	8,21 10 ⁻³
NPIP	214/760	16,0	0,0260	4,44	10,7 10 ⁻³
NPIR	215/721	19,6	0,0335	0,661	2,90 10 ⁻³

P.e.: ponto de ebulição; *Sensibilidade obtida a partir de curvas analítica (área vs. massa em ng); **Temperatura: 45 $^{\circ}\text{C}$; ***Condições descritas em VI.3.8.3, pág.117; ****Condições descritas em VI.4.1.2.1, pág.130.

VI.4.1.2.2 - PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Uma vez otimizadas as condições analíticas para a extração e quantificação das N-nitrosaminas por HS-SPME-GC-TEA, o método foi validado com o objetivo de garantir a exatidão, seletividade, reprodutibilidade e robustez dentro da faixa na qual as N-nitrosaminas serão analisadas.

O método HS-SPME-GC-TEA proposto para a determinação de nitrosaminas em lingüiças foi validado por avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, recuperação, repetibilidade, limite de detecção e limite de determinação, cujos parâmetros estão apresentados na Tabela VI.10.

Tabela VI.10 - Parâmetros de validação para a determinação de nitrosaminas em lingüiças por HS-SPME-GC-TEA.

Parâmetros de validação	NDMA	NDEA	NPIP	NPIR
Faixa linear (ng)	60,0 a 720	60,0 a 720	60,0 a 720	60,0 a 720
Linearidade	0,9935	0,9870	0,9955	0,9944
Sensibilidade (u.a. ng ⁻¹)	1,60 10 ⁻³	8,21 10 ⁻³	10,7 10 ⁻³	2,90 10 ⁻³
Repetibilidade (% RSD, n=6) 360 ng	5	5	6	12
Recuperação (%)*	105	110	105	107
Limite de detecção (µg kg ⁻¹)**	3	3	3	3
Limite de quantificação (µg kg ⁻¹)**	10	10	10	10

(*) A recuperação foi calculada a partir da curva de adição padrão.

(**) Os limites de detecção e quantificação foram calculados com base em uma amostra de 2,5 g.

A exatidão do método foi avaliada mediante teste de recuperação. O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados pela razão do sinal-ruído de 3 e 10, respectivamente, medidos na proximidade do tempo de retenção dos analitos correspondentes.

As curvas analíticas foram realizadas por adição padrão, devido a interferência da matriz e apresentaram linearidades adequadas (Figura VI.12.).

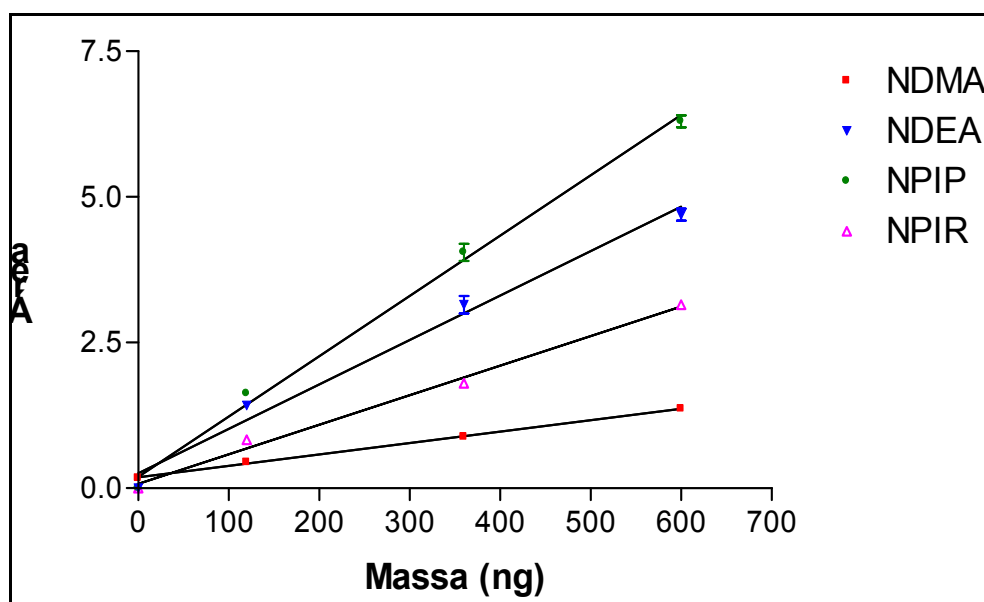


Figura VI.12.- Curvas de adição padrão (n=3) para a NDMA, NDEA, NPIP e NPIR.

A repetibilidade do método foi avaliada através da precisão intra-ensaio, analisando-se uma amostra fortificada com 360 ng (n=6). O resultado foi expresso como estimativa do desvio padrão (RSD), apresentando-se uma variação de no máximo 12 %, dentro da variação máxima considerada que é de 16 % (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC, 2002).

A partir dos dados obtidos verifica-se que o método de extração HS-SPME-GC-TEA apresenta sensibilidade adequada para a determinação de N-nitrosaminas em produtos cárneos. A frequência de determinações no sistema HS-SPME-GC-TEA foi de 2 determinações por hora.

VI.4.1.2.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS POR HS-SPME-GC-TEA

As amostras de lingüiça tipo frescal foram analisadas por HS-SPME-GC-TEA, utilizando a fibra PDMS-DVB (Figura VI.13.). Para tanto, as condições do sistema HS-SPME e GC-TEA foram ajustadas de acordo com o estabelecido nos itens VI.4.1.1.1 e V.4.1, respectivamente.

Pelo fato da matriz influenciar na eficiência de extração, o procedimento adequado para a determinação de nitrosaminas voláteis em amostras de alimentos é o método de adição padrão. Portanto, foram realizadas curvas de adição padrão para cada nitrosamina estudada com três adições de 120, 360 e 600 ng sobre uma massa de 2,5 g de amostra.

As amostras analisadas estão representadas na Tabela VI.11.

Tabela VI.11 - Resultados da determinação de NDMA em amostras de lingüiças tipo frescal.

Amostras	Concentração de Nitrosaminas $\pm$ S			
	($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	NDMA	NDEA	NPIP	NPIR
1	44 $\pm$ 1	n.d.	n.d.	n.d.
2	15 $\pm$ 1	n.d.	n.d.	n.d.
3	22 $\pm$ 2	n.d.	n.d.	n.d.
4	18 $\pm$ 1	n.d.	n.d.	n.d.

S = Estimativa do desvio padrão absoluto da média (n=3) da concentração de nitrosaminas. n.d. = não detectada ($< 3 \mu\text{g kg}^{-1}$).

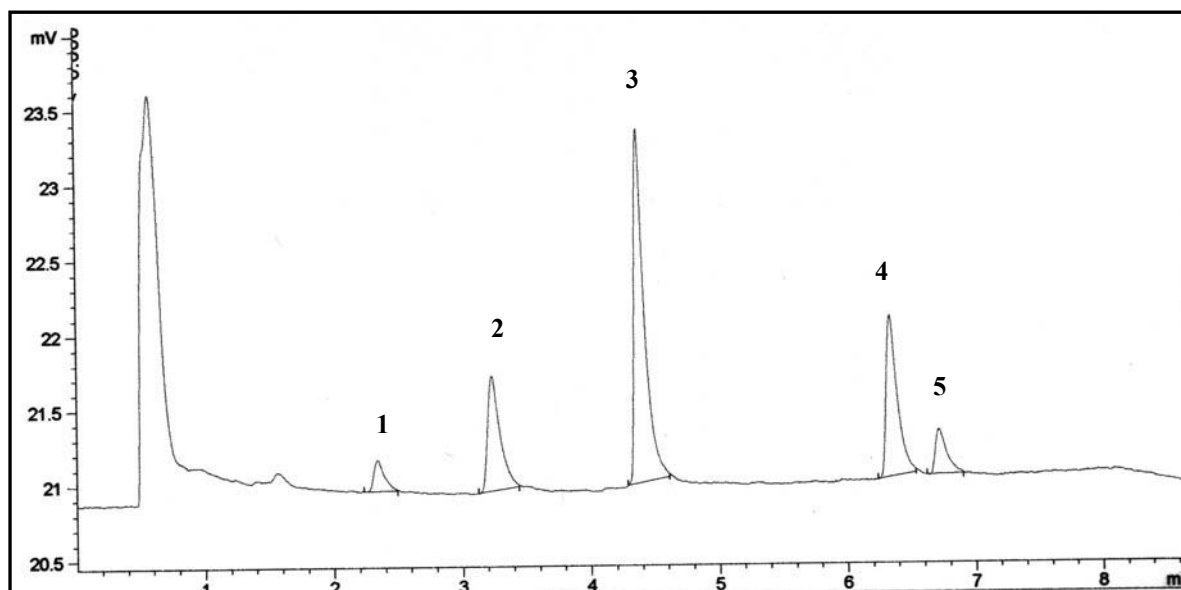


Figura VI.13 – Cromatograma obtido por HS-SPME-GC-TEA de uma amostra de linguiça (m = 2,5 g) fortificada com 600 ng de 1-NDMA (t_R = 2,3 min.); 2-NDEA (t_R = 3,2 min.); 4-NPIP (t_R = 6,3 min.); 5-NPIR (t_R = 6,7 min.) e 360 ng de 3-NPBA (t_R = 4,5 min.). Condições cromatográficas descritas nos itens VI.4.1.1.1 e V.4.1.

A NDMA foi detectada nas quatro amostras de linguiças analisadas apresentando teor de NDMA acima de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, que é o nível de ação estabelecido pela Agência de Inspeção de Alimentos do Canadá para carnes curadas (CANADÁ, 2003). A NDEA, NPIP e a NPIR não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas.

A utilização do sistema hifenado HS-SPME-GC-TEA, apresentou grandes vantagens frente aos métodos citados na literatura como SPE (RAOUL *et al.*, 1997; SANCHES FILHO, 2003), extração líquido-líquido (ATAWODI, 2003) e o método recomendado pela AOAC (AOAC, 1997) que utilizam grandes volumes de solventes orgânicos, apresentam perdas durante a extração e são trabalhosos.

VI-5 CONCLUSÕES

O cartucho florisil apresentou recuperação adequada quando avaliado pela SPE na extração de soluções aquosas contendo as N-nitrosaminas em estudo. Entretanto, esta mesma fase avaliada no preparo de amostras de linguiças nas determinações de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR, apresentaram baixa recuperação, na faixa de 49 a 84 %, devido a complexidade da matriz e perdas durante a pré-extração do analito.

O sistema HS-SPME-GC-TEA apresentou vantagens em relação a SPE como simplicidade de manuseio, menor custo, eficiência, sensibilidade e repetibilidade adequada na determinação de nitrosaminas em amostras de linguiças, além de não utilizar solventes orgânicos.

Os níveis de NDMA encontrados nas amostras de linguiças analisadas foram acima de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, que é o nível de ação estabelecido pela Agência de Inspeção de Alimentos do Canadá para carnes curadas (CANADÁ, 2003), sendo assim necessário um monitoramento das N-nitrosaminas, a fim de estabelecer limites máximos desses compostos em alimentos brasileiros.

CAPÍTULO VII – CONCLUSÕES GERAIS

- O método de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica desenvolvido para determinação de nitrato e nitrito através do complexo ternário FeSCNNO^+ , é adequado para o monitoramento dessas espécies em produtos cárneos e apresenta, em relação ao método espectrofotométrico oficial recomendado pela AOAC, as seguintes vantagens: emprego de reagentes não carcinogênicos, baixo consumo de reagentes, elevada frequência analítica (5 análises completas/hora) menor manipulação das amostras.
- As amostras de linguiças e salsichas analisadas estão de acordo com a legislação vigente quanto aos teores de nitrato e nitrito, ou seja, apresentaram valores inferiores a 150 e 300 mg kg⁻¹ para nitrito e nitrato, respectivamente.
- O método de HS-SPME-GC-TEA desenvolvido para a determinação de nitrosaminas em linguiças apresenta sensibilidade e seletividade adequada para a determinação destes compostos tóxicos em alimentos, tendo em vista que o nível de ação estabelecido pelo FDA (Food and Drug Administration dos Estados Unidos) ser de 10 µg kg⁻¹. Comparando-se as técnicas de SPE e SPME, na extração das nitrosaminas da matriz, conclui-se que a técnica de SPME apresenta as seguintes vantagens frente a SPE: dispensa o uso de solventes, menor manipulação de amostras, análise sem geração de resíduos, menor custo, maior repetibilidade e menor tempo de análise.
- O preparo de amostras empregando a microextração em fase sólida com amostragem no headspace oferece vantagens em relação à destilação à vácuo (método oficial AOAC), principalmente no que tange a simplicidade de execução, tempo e manipulação da amostra.

- A fibra de sílica recoberta com PDMS-DVB, espessura de 65 μm , apresenta uma melhor eficiência de extração para as nitrosaminas NDMA e NDEA por HS-SPME, enquanto a fibra recoberta com PA de espessura de 85 μm apresentou melhor eficiência de extração para as nitrosaminas NPIP e NPIR.
- A matriz alimento, contendo um alto teor de lipídeos, exerce efeito importante sobre o processo e a eficiência de extração das nitrosaminas por HS-SPME. Portanto, a otimização e desenvolvimento de métodos por HS-SPME devem ser realizados com a matriz e a quantificação deve ser realizada por adição padrão.
- A NDMA foi encontrada em lingüiças comercializadas na região de Campinas, acima do nível de ação estabelecido pelo FDA, o que vem a sugerir a necessidade de monitorar esses compostos também no Brasil e indicam a necessidade de rever aspectos de legislação para que sejam estabelecidos valores de máximo de resíduos de nitrosaminas para alimentos comercializados no Brasil.
- O método de GC-MS otimizado tem sensibilidade para ser empregado para a confirmação de identidade das N-nitrosaminas nas amostras de lingüiça.

CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED M.J.; STALIKAS, C.D.; TZOUWARA-KARAYANNI, S.M.; KARAYANNIS, M.I. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite by flow-injection analysis. **Talanta**, v.43, p.1009-1018, 1996.

AHN, H.J.; KIM, J.H; JO, C.; YOOK, H.S; LEE, H.J.; BYUN, M.W. N-nitrosamine reduction in salted and fermented anchovy sauce by ionizing irradiation. **Food Control**, v.14, n. 8, p. 553-557, 2003.

ALPENDURADA, M.F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v.889, p.3-14, 2000.

ANDERSON, R. **Sample Pretreatment and separation**. Analytical Chemistry by Open Learning. Chichester, John Wiley, 1991, 632p.

AOAC Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Method 982.22 (16th ed.) Gaithersburg, 1997.

AOAC Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Method 984.18 (16th ed.) Gaithersburg, 1997.

ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v.62, n.19, p.2145-2148, 1990.

ATANASOVA-GORANOVA, V.K.; DIMOVA, P.L.; PEVICHAROVA, G.T. Effect of food products on endogenous generation of N-nitrosamines in rats. **British Journal of Nutrition**, v.78, p.335-345, 1997.

ATAWODI, S.E. Occurrence of preformed volatile nitrosamines in preparations of some Nigerian medicinal plants: a preliminary report. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p.551-554, 2003.

AUGUSTO, F.; VALENTE, A.L.P. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.21 n.6-7, p.428-438, 2002.

BARTSCH, H.; MONTESANO, R. Relevance of nitrosamines to human cancer. **Carcinogenesis**, v.5, p.1381-1393, 1984.

BAUERNFEIND, J. C.; PINKERT, D. M. Food processing with added ascorbic acid. **Advances in Food Research**, v. 18, p. 219-315, 1970.

BERTOTTI, M.; PLETCHER, D. Amperometric determination of nitrite via reaction with iodide using microelectrodes. **Analytica Chimica Acta**, v.337, p.49-55, 1997.

BIAUDET, H.; MAVELLE, T.; DEBRY, G. Mean daily intake of nitrosodimethylamine from food and beverages in France in 1987-1992. **Food and Chemical Toxicology**, v.32, n.5, p.417-421, 1994.

BLANCH, G.P.; CAJA, M.M; CASTILLO, M.L.R.; HERRAIZ, M. Comparison of different methods for the evaluation of the authenticity of olive oil and hazelnut oil. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3153-3157, 1998.

BORONAT, M.D.C.T.; PADROS, R.B.; ALONSO, M.I. Nitratos y nitritos en la alimentacion infantil: riesgos de su ingesta. **Alimentaria**, v.138, p.31-35, 1982.

BRANCO, S. M., ROCHA, A. A. **Poluição, proteção e usos múltiplos de represas**. São Paulo: CETESB, 1977. 185p.

BRASIL, Portaria [n.º 146, de 7 de março de 1996](#). Regulamento Técnico de identidade dos queijos. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 11 mar. 1996.

BRASIL. Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998. Regulamento Técnico de Atribuição de Função de Aditivos, e seus Limites Máximos de Uso para a

Categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 22 mar. 1999.

BRASIL. Portaria MS nº 1.469, de 29 de dezembro de 2000. Regulamento Técnico de Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 2 Jan. 2001.

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

BRUNING-FANN, C.S., KANEENE, J.B. The effects of nitrate, nitrite, and n-nitroso compounds on human health: a review. **Veterinary and Human Toxicology**, v.35, p.521-538, 1993.

BULDT, A.; KARST, U. Determination of nitrite in waters by microplate fluorescence spectroscopy and HPLC with fluorescence detection. **Analytical Chemistry**, v.71, p.3003-3007, 1999.

BUTT, S.B., RIAZ M. ; IQBAL, M.Z. Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair liquid chromatography. **Talanta**, v.55, n.4, p.789–797, 2001.

BUTZKE, C.E.; EBELER, S.E.; TERRIEN, M.B. Analysis of brandy aroma by solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.625-630, 2000.

CANADA - Canadian Food Inspection Agency- Animal Products Food of Animal Origin -Livestock and Meat Processing– Nitrosamines. Date Modified: 2003-02-07 Disponível:<<http://www.inspection.gc.ca/english/anima/meavia/mmopmmhv/chap5/5.4-7e.shtml>>. Acesso em 05 fev. 2004.

CÁRDENES, L.; AYALA, J.H.; GONZÁLES, V.; AFONSO, A.M. Fast microwave-assisted dansylation of N-nitrosamines analysis by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v.946, p.133-140, 2002.

CASSENS, R.G. Composition and safety of cured meats in the USA. **Food Chemistry**, v.59, n.4, p.561-566, 1997.

CHEN, H.; FANG, Y.; NA, T.; JIN, X. Flow-injection catalytic spectrophotometric determination of trace amounts of nitrite. **Analytical Letters**, v.32, n.14, p.2887-2897, 1999.

CHOI, S.Y.; CHUNG, M.J.; SUNG, N.J. Volatile N-nitrosamine inhibition after intake Korean green tea and Maesil (*Prunus mume* SIEB. et ZACC.) extracts with an amine rich diet in subjects ingesting nitrate. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.949-957, 2002.

CHUNG, S.Y.; KIM, J.S.; KIM, M.; HONG, M.K.; LEE, J.O.; KIM, C.M.; SONG, I.S. Survey of nitrate and nitrite contents of vegetables grown in Korea. **Food Additives and Contaminants**, v.20, p.621-628, 2003.

CLYDESDALE, F. M.; FRANCIS, F. J. Pigments. In: Fennema, O, R. ed. Principles of Food Science. Part I. **Food Chemistry**, v. 4, p.393-402, 1976.

CONNOLLY, D.; PAULL, B. Rapid determination of nitrate and nitrite in drinking water samples using ion-interaction liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 441, n.1, p.53-62, 2001.

CORNÉE,J.; LAIRON, D. VELEMA, J.; GUYADER,M.; BERTHEZENE, P. An estimate of nitrate, nitrite and N-nitrosodimethylamine concentrations in French food products of food groups. **Sciences Des Aliments**, v.12, v.155-197, 1992.

CORNFORTH, D. Color– its basis and importance. In: Pearson, A. M.; Dutson, T. R. ed. *Advances in Meat Research: Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products*. 1^a ed. New York: AVI Book, 1994.

CORTAS, N.K.; WAKID, N.W. Pharmacokinetics aspects of inorganic nitrate ingestion in man. **Pharmacology and Toxicology**, v.68, p.192-193, 1991.

CRADDOCK, V.M. Aetiology of oesophageal cancer: some operative factors. **Europeun Journal of Cancer Prevention**, v.1, p. 89-103, 1992.

DAVIS, J.; MOORCROFT, M.J.; WILKINS, S.J.; COMPTON, R.G.; CARDOSI, M.F. Electrochemical detection of nitrate and nitrite at copper modified electrode. **Analyst**, v.125, p.737-741, 2000.

DI MATTEO, V.; ESPOSITO, E. Methods for determination of nitrite by high-performace liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of cromatography A**. v.789, p.213-219, 1997.

DOUGLASS, M.L.; KABACOFF, B.L.; ANDERSON, G.A. and CHENG, M.C. The chemistry of nitrosamine formation, inhibition and destruction. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 29, p.581-606, 1978.

DUNHAM, A.J; BARKLEY, R.M.; SIEVERS, R.E. Aqueous nitrite ion determination by selective reduction and gas phase nitric oxide chemiluminescence. **Analytical Chemistry**, v.67, n. 1, p. 220-224, 1995.

ELLIOTT, R.J.; PORTER, A.G. A rapid cadmium reduction method for the determination of nitrate in bacon and curing brines. **Analyst**, v.96, p.522-527, 1971.

ENSAFI, A.A.; KAZEMZADEH, A. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow injection with spectrophotometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v.382, p.15-21,1999.

EUROPEAN COMMISSION REGULATION 2002/657/EC, 12 August, **Official Journal of the European Communities**, L 221, 2002.

FAN, T.Y., TANNENBAUM, S.R. Stability of N-nitroso compounds. **Journal of Food Science**, v.37, p.274, 1972.

FAN, T.Y., TANNENBAUM, S.R. Factors influencing the rate of formation of nitrosomorpholine from morpholine and nitrite: acceleration by thiocyanate and other anions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.21, n.2, p.237, 1973.

FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; LIMA, J.L.F.C.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M.; OLMOS, R.P.; RIOS, A. Simultaneous assay of nitrite, nitrate and chloride in meat products by FIA. **Analyst**, v. 121, n. 10, p. 1393-1396, 1996.

FIDDLER, W.; PENSABENE, J.W. Supercritical fluid extraction of volatile N-nitrosamines in fried bacon and its dripping: methods comparison. **Journal of AOAC International**, v.79, n.4, p.895-901, 1996.

FIDDLER, W.; PENSABENE, J.W.; PIOTROWSKI, E.G.; DOERR, R.C.; WASSERMAN, A.E. Use of sodium ascorbate or erythorbate to inhibit formation of N-nitrosodimethylamine in frankfurters. **Journal of Food Science**, v.38, p.1084, 1973.

FIGUEIREDO, I.B. Nitritos e compostos nitrogenados em alimentos. **Boletim do ITAL**, v.18, n.4, p.449-468, 1981.

FOLLET, M.J.; RATCLIFF, P.W. Determination of nitrite and nitrate in meat products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.14, p.138-144, 1963.

FOX, J.B.JR.; ACKERMAN, S.A. Formation of nitric oxide myoglobin: mechanisms of the reaction with various reductants. **Journal of Food Science**, v. 33, n. 4, p. 364-370, 1968.

FRIDMAN, A.L.; MUKHAMETSHIN F.M.; NOVIKOV, S.S. Advances in the chemistry of aliphatic N-nitrosamines. **Russian Chemical Reviews**, v.40, p.30, 1971.

FRITZ, J.S.; MACKA, M. Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. **Journal of Chromatography A**, v.902, p.137-166, 2000.

GABRIEL, D.; BAEZA, J.; VELERO, F.; LAFUENTE, J. A novel FIA configuration for the simultaneous determination of nitrate and nitrite and its use for monitoring an urban waste water treatment plant based on N/D criteria. **Analytica Chimica Acta**, v.359, p.173-183, 1998.

GINÉ, M.F.; BERGAMIN, F.H.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F. Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.114, p.191-197, 1980.

GLÓRIA, M.B.A. , BARBOUR, J.F., SCANLAN, R.A. Volatile nitrosamines in fried bacon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1816-1818, 1997.

GOUGH, T.A.; GOODHEAD, K.; WALTERS, G.L Distribution of some volatile nitrosamines in cooked bacon. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.27, p.181-185, 1976.

GRAY, J.I.; RANDALL, C.J. The nitrite/N-nitrosamine problem in meats: an update. **Journal of Food Protection**, v.42, n.2, p.168, 1979.

GRAY, J.I.; REDDY, S.K.; PRICE J.F.; MANDAGUERE, A.K.; WILKENS W.F. Inhibition of N-nitrosamines in bacon. **Food Technology**, v.36, n.6, p. 39-43, 1982.

HAGHIGHI, B.; TAVASSOLI, A. Flow injection analysis of nitrite by gas phase molecular absorption UV spectrophotometry. **Talanta**, v.56, n.1,p. 137-144, 2002.

HAVERY, D.C.; FAZIO, T. Human exposure to nitrosamines from feeds. **Food Technology**, v.79, p.80-83, 1985.

HAWTHORNE, S.B. **Supercritical fluid extraction and its use in chromatographic sample preparation**, 10^a ed., Blackie Academic & Professional, New York, 1993.

HE, Z. K.; FUHRMANN, B.; SPOHN, U. Precise and sensitive determination of nitrite by coulometric backtitration under flow conditions. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.37, n.3, p. 264 – 269, 2000.

HELSEY, M.A.; HOTCHKISS, J.H.; ROE, D.A. Influence of fruit and vegetable juice on the endogenous formation of N-nitrosoproline and N-nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid in human on controlled diets. **Carcinogenesis**, v.13, p.2277-2280, 1992.

HENNION, M.C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.856, p.3–54, 1999.

HILL, M.J. Nitrosamines, In: SHUKER, D.E.G. **The chemistry of N-nitrosation**, Chichester, John Wiley, 1988, 167p.

HILTON, J.; RIGG, E. Determination of nitrate in lake water by the adaptation of the hydrazine-copper reduction method for use on a discrete analyser: performance statistics and an instrument-induced difference from segmented flow conditions, **Analyst**, v.108, n.1289, p.1026-1028, 1983.

HOTCHKISS, J.H.; CASSENS, R.G. Nitrate, nitrite and nitroso compounds in foods. **Food Technology in Australia**, 40, p.100-105, 1988.

HOTCHKISS, J.H.; HELSER, M.A.; MARAGOS, C.M.; WENG, Y.M. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. Food Safety and Biological Implications. ASC Symposium Series 484, Washington, DC, **American Chemical Society**, 1992.

HUANG, Z.; KORENAGA, T.; HELALEH, M.I.H. Kinetic Spectrofluorimetric Determination of Nitrite in Water Samples and Nitrogen Dioxide in the Atmosphere Sampled by the Liquid Droplet Method. **Microchimica Acta**, v.134, n.3-4, p.179-183, 2000.

IARC. Report of the Subcommittee on Analytical Methods for N-nitroso Compounds". In: Bogovski, P.; Prewssman, R.; Walker, E.A. eds. N-nitroso compounds analysis and formation (IARC Scientific Publications No. 3), **Lyon - International Agency for Research on Cancer**, p.92-94, 1972.

IFT- Institute of Food Technologists – Scientific status summary - Nitrate, nitrite, and nitroso compounds in Foods - **Food Technology**, v.41, n.4, p.127-134, 1987.

IKKEN, Y.; CAMBERO, I.; MARÍN, M.L.; MARTÍNEZ, A.; HAZA, A.I.; MORALES, P. Antimutagenic effects of fruit and vegetables aqueous extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p. 5194-5200, 1998.

IZUMI, K.; CASSENS, R. G.; GREASER, M. L. Reaction of nitrite with ascorbic acid and its significant role in nitrite cured foods. **Meat Science**, v. 26, p. 141-145, 1989.

JAFFÉ, E.E. Methaemoglobinaemia. **Clinics Haematology**, v.10, p. 99-122, 1981.

JUDGE, M.D.; ABERLE, E.D.; FORREST, J.C. **Principles of Meat Science**. 3^a ed. Published by Kendall/Hunt Publishing Co., 1989, 351 p.

KATAOKA, H.; LORD, H.L; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis, **Journal of Chromatography A**, v.880, p. 35-62, 2000.

KAWABATA, T.; UIBU, J.; OSHIMA, H.; MATSUI, M.; HAMANO, M.; TOKIWA, H. Occurrence, formation and precursors of N-nitroso compounds in Japanese diet. In "N-nitroso compounds; analysis, formation and occurrence," ed. WALKER, E.A. CASTEGNARO, M.; GRICIUTE, L.; BORZSONYI. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, France, v.31, p.481, 1980.

KAWAKAMI, T.; IGRASHI, S. Highly sensitive spectrophotometric determination of nitrite ion using 5,10,15,20-tetrakis(4-aminophenyl)porphine for application to natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v.333, p.175-180, 1996.

KAZEMZADEH, A.; ENSAFI, A. A. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow-injection spectrophotometric detection. **Microchemical Journal**, v.69, p.159-166, 2001.

KELLNER, R.; MERMET, J.M.;OTTO, M.; WIDMER, H.M. **Analytical Chemistry**, Wiley-VCH, Berlin, 1998.

KIM, H.J.; CHANG, W.K.; KIM, M.K.; LEE, S.S.; CHOI, B.Y. Dietary Factors and Gastric Cancer in Korea: A Case-Control Study. **International Journal of Cancer**, v.97, p.531-535, 2002.

KLEIN, R.G. Calculations and measurements on the volatility of N-nitrosamines and their aqueous solutions. **Toxicology**, v.23, p.135-147, 1982.

KNIGHT, T.M.; FORMAN, D.; AL-DABBAGH, S.A; DOLL, R. Estimation of dietary intake of nitrate and nitrite in Great Britain. **Food and Chemical Toxicology**, v.25, n.4, p.227-235, 1987.

KOUPPARIS, M.A., WALCZAK, K.M. ; MALMSTADT, H.V. Kinetic determination of nitrite in water by using a stopped-flow analyzer. **Analyst**, v.107, p.1309-1315, 1982.

KRUTZ, L.J., SENSEMAN, S.A., SCIUMBATO, A.S. Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v.999, n.1-2, p.103-125, 2002.

KYRIAKIDIS N.B.; TARANTILI-GEORGIOUS, K.; TSANI-BATZAKA, E. Nitrate and nitrite content of greek cheeses. **Journal of Food Compositions and Analysis**, v.10, p.343-349, 1997.

LANG, Q.; WAI C.M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - A practical review. **Talanta**, v.53, p.771-782, 2001.

LARA, W.H.; TAKASHI, M.Y.; YABIKU, H.Y. Níveis de nitrato em alimentos infantis. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.40, n.2, 147-152, 1980.

LARRÁYOZ, P.; CARBONELL, M.; TORRE, F.I.P.; BARCINA, Y. Optimization of indirect parameters which affect the extractability of volatile aroma compounds from Idiazábal cheese using analytical supercritical fluid extractions (SFE). **Food Chemistry**, v.64, p.123-127, 1999.

LI, J.Z.; WU, X.C.; YUAN, R.; LIN, H.G.; YU, R.Q. Cobalt phthalocyanine derivatives as neutral carriers for nitrite-sensitive poly (vinyl chloride) membrane electrodes. **Analyst**, v.119, n.6, p.1363-1366, 1994.

LIANG, B., IWATSUKI, M.; FUKASAWA, T. Catalytic spectrophotometric determination of nitrite using the chlorpromazine hydrogen-peroxide redox reaction in acetic-acid medium. **Analyst**, v.119, n.9, p.2113-2117, 1994.

LOEPPKY, R.N.; MICHEJDA, G.J. **Nitrosamines and related N-nitroso compounds**. Chemistry and Biochemistry. ACS Symposium Series 553. Washington, DC: American Chemical Society, 1994.

LUQUE-PÉREZ, E.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Automated flow-injection spectrophotometric determination of nitrosamines in solid food samples. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v.371, p.891-895, 2001.

LEVALLOIS, P.; AYOTTE, P.; VAN MAANEN J.M.S.; DESROSIERS, T.; GINGRAS, S.; DALLINGA, J.W.; VERMEER, I.T.M.; ZEE, J.; POIRIER, G. Excretion of volatile nitrosamines in a rural population in relation to food and drinking water consumption. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, p.1013-1019, 2000.

MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Great Britain). Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in food: Second Report. **Food Surveillance Paper** N°32, 1992.

MAFF. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. **Food Surveillance** Information Sheet 177: Nitrate in lettuce and spinach. United Kingdom, 1999. Disponível em <http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1999/no177/177nitra.htm>. Acesso em: 05 fev. 2004.

MAGEE, P.N.; BARNES, J.M. Carcinogenic N-nitroso compounds. **Advances in Cancer Research**, v.10, p.164-246, 1967.

MAGEE, P.N.; BARNES, J.M. The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. **British Journal of Cancer**, v.10, p.114-122, 1956.

MAKI, T.; TAMURA, Y.; SHIMAMURA, Y.; NAOI, Y. Estimate of the volatile nitrosamine content of Japanese food. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.25, p.257-259, 1980.

MARTIN, S.; RESTANI, P. Determination of nitrates by a novel ion chromatographic method: occurrence in leafy vegetables (organic and conventional) and exposure assessment for italian consumers. **Food Additives and Contaminants**, v.20, p.787-792, 2003.

MAVELLE, T., BOUCHIKHI, B., DEBRY, G. The occurrence of volatile N-nitrosamines in French foodstuffs. **Food Chemistry**, v.42, p.321-338, 1991.

McKNIGHT, G.M; DUNCAN, C.W.; LEIFERT, C.; GOLDEN, M.H. Dietary nitrate in man: friend or foe? **British Journal of Nutrition**, v.81, p.349-358, 1999.

MERINO, L.; EDBERG, U.; FUCHS, G.; AMAN, P. Liquid chromatographic determination of residual nitrite/nitrate in foods: NMKL collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 83, n.2, p. 365-375, 2000.

MIKUSKA, P.; VECERA, Z., Simultaneous determination of nitrite and nitrate in water by chemiluminescent flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 495, n.1-2, p. 225-232, 2003.

MIRVISH, S.S., Formation of Nitroso Compounds: Chemistry, kinetics, and *in vivo* occurrence. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.31, p.325-351, 1975.

MIRVISH S.S. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. **Cancer Letter**, v.93, p.17-48, 1995.

MIRVISH, S.S. Experimental evidence for inhibition of N-Nitroso compound formation as a factor in the negative correlation between vitamin C consumption and the incidence of certain cancers. **Cancer Research (Suppl.)**, v.54, 1948s-1951s, 1994.

MIRVISH, S.S, GREENBLATT, M., KOMMINENI, V.R.C., Nitrosamine formation in vivo: Induction of lung adenomas in Swiss mice by concurrent feeding of nitrite and methylurea or ethylurea. **Journal of the National Cancer Institute**, v.48, p.1311-1315, 1972.

MITACEK, E.J.; BRUNNEMANN, K.D.; SUTTAJIT, M.; MARTIN, N.; LIMSILA, T.; OHSHIMA, H.; CAPLAN, L.S. Exposure to N-nitroso compounds in a population of high liver cancer regions in Thailand: Volatile nitrosamine (VNA) levels in Thai food. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.297-305, 1999.

MITCH, W.A.; GERECKE, A.C.; SEDLAK, D.L. A N-Nitrosodimethylamine (NDMA) precursor analysis for chlorination of water and wastewater. **Water Research**, v.37, n.15, p.3733-3741, 2003.

MIYADO, T.; NAGAI, H.; TAKEDA, S.; SAITO, K.; FUKUSHI, K.; YOSHIDA, Y.; WAKIDA, S.; NIKI, E. Development of a novel running buffer for the simultaneous determination of nitrate and nitrite in human serum by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1014, n.1-2, p. 197-202, 2003.

MONSER, L.; SADOK, S.; GREENWAY, G. M.; SHAH, I.; UGLOW, R. F. A simple simultaneous flow injection method based on phosphomolybdenum chemistry for

nitrate and nitrite determinations in water and fish samples. **Talanta**, v. 57, n.3, p. 511-518, 2002.

MOORCROFT, M.J.; DAVIS, J.; COMPTON, R.G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v.54, p785-803, 2001.

MOORE, J. W., MOORE, E. A. **Environmental Chemistry**. New York: Academic Press, 1976, 500 p.

MORALES, M.T.; BERRY, A.J.; McINTYRE, P.S.; APARICIO R. Tentative analysis of virgin olive oil aroma by supercritical fluid extraction-high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.819, p.267-275, 1998.

MOURZINA, Y. G.; ERMOLENKO, Y. E.; YOSHINOBU, T.; VLASOV, Y.; IWASAKI H.; SCHÖNING, M. J. Anion-selective light-addressable potentiometric sensors (LAPS) for the determination of nitrate and sulphate ions. **Sensor and Actuators B: Chemical**, v. 91, n.1-3, p. 32-38, 2003.

MOUSAVI, M. F.; JABBARI, A.; NOUROOZI, S. A sensitive flow-injection method for determination of trace amounts of nitrite. **Talanta**, v.45, p.1247-1253, 1998.

NAKAMURA, M.; BABA, M.; NAKAOKA, T.; WADA, Y.; ISHIBASHI, T.; KAWABATA, T. Pathways of formation of N-nitrosopyrrolidine in fried bacon. **Journal of Food Science**, v.41, p. 874-877, 1976.

NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; DIEGO, J. C.; GÓMEZ, L. A.; RUIZ, J. M.; HIGES M. Determination of oxalate, sulfate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.881, n. 1-2, p. 629-639, 2000.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. Atheneu Editora de São Paulo, São Paulo, 1996, p. 434.

O'KEEFFE, M.; KENNEDY, O. Residues – A food safety problem? **Journal of Food Safety**, v.18, p.297-319, 1998.

OLIVEIRA, C.P.; GLÓRIA, M.B.A.; BARBOUR, J.F.; SCALAN, R.A. Nitrate, nitrite, and volatile nitrosamines in whey-containing food products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.967-969, 1995.

OLMEDO, R.G. ; BOSCH, N.B. Aspectos Toxicologicos de la presencia de nitratos y nitritos en los productos hortícolas cocidos y en su agua de cocción. **Alimentaria**, v.25, n.191, p.71-75, 1988.

ÖZTEKIN, N.; NUTKU, M. S.; ERIM, F. B. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v.76, n.1, p.103-106, 2002.

PARDI, M.C., SANTOS, M. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. Niterói, RJ: EDUFF, 1996, 1110p.

PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction: Theory and Practice**, Wiley-VCH, New York, 1997.

PENNINGTON, J.A.T. Dietary exposure models for nitrates and nitrites. **Food Control**, v.9, p.385-395, 1998.

PENSABENE, J.W.; FIDDLER, W. Formation and inhibition of N-nitrosothiazolidine in bacon. **Food Technology**, v.79, p.91-94, 1985.

PENSABENE, J.W., FIDDLER, W. Gas chromatographic/thermal energy analyzer method for N-nitrosodibenzylamine in hams processed with elastic rubber netting. **Journal of AOAC International**, v.77, p.981-984, 1994.

PENSABENE, J.W., FIDDLER, W., GATES, R.A. Solid-phase extraction method for volatile N-nitrosamines in hams processed with elastic rubber netting. **Journal of AOAC International**, v.75, p.438-442, 1992.

PÉREZ-OLMOS, R.; RIOS, A.; FERNÁNDEZ, J. R.; LAPA, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C. Construction and evaluation of ion selective electrodes for nitrate with a summing operational amplifier. Application to tobacco analysis. **Talanta**, v. 53, n.4, p. 741-748, 2001.

PHILLIPS, W.E.J. Nitrate content of foods – Public health implications. **Journal of Institute Canadian Technology Aliment**, v.1, n.3, p.98, 1968.

PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; FERREIRA, M.A. FIA evaluation of nitrite and nitrate contents of liver pâtés. **Food Chemistry**, v.63, n.3, p.359-362, 1998.

POTTER, J.D. Nutrition and colorectal cancer. **Cancer Causes Control**, v.7, n.1, p. 127-146, 1996

POURAZRANG, H.; MOAZZAMI, A.A. ; BAZZAZ, B.S.F. Inhibition of mutagenic N-nitroso compound formation in sausage sample by using L-ascorbic acid and α -tocopherol. **Meat Science**, v.62, p.479-483, 2002.

PREUSSMANN, R., STEWART, B.W., **N-nitrosocarcinogens**. ACS Monographs, v.182, p.643-828, 1984.

PRICE, J.F., SCHWEIGERT, B.S. **Ciência de la carne y de los productos cárnicos**. Zaragoza: Acribia, 1994. 581p.

PURVES, W.K.; SADAVA, D.; ORIAN, G.H.; HELLER, H.C. **Life, The Science of Biology**, 6. ed. Sinauer e Freeman, Massachusetts, USA, 2001. 1044 p.

QUACH, M.L; CHEN, X.D; STEVENSON, R.J. Headspace sampling of whey protein concentrate solutions using solid-phase microextraction. **Food Research International**, v.31, n.5, p.371-379, 1999.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n.1, 68-76, 2001.

RAOUL, S., GREMAUD, E., BIAUDET H., TURESKY R.J. Rapid solid-phase extraction method for the detection of volatile nitrosamines in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , v.45, p.4706-4713, 1997.

REYES, F.G.R.; SCANLAN, R.A. N-nitrosaminas: Formação e ocorrência em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.18, n.4, p.299-309, 1984.

ROCHE, M.O.G.; MELIAN, M.G.; PEREZ, R.C. **Nitratos, nitritos y compuestos de N-nitroso**. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS, Metepec, Estado de México, México, Serie Vigilancia, 13, 1994.

ROSSI, D.T.; ZHANG, N. Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects, **Journal of Chromatography A**, v.885, p.97-113, 2000.

RYWOTYCKI, R. The effect of selected functional additives and heat treatment on nitrosamine content in pasteurized pork ham. **Meat Science**, v.60, p.335-339, 2002.

RYWOTYCKI, R. Meat nitrosamine contamination level depending on animal breeding factors. **Meat Science**, v. 65, n.1 , p.669-676,2003.

SANCHES FILHO, P.J.; ZANIN, K.D.; CARAMÃO E.B.; GARCIA, R.C.; RIOS A. VALCÁRCEL, M. Pré-concentração de nitrosaminas a partir de amostras aquosas

por extração em fase sólida e cromatografia capilar eletrocinética micelar. **Química Nova**, v. 26, n.2, p. 193-196, 2003.

SANCHES FILHO, P.J.; RIOS A.; VALCÁRCEL, M.; ZANIN, K.D.; CARAMÃO E.B. Determination of nitrosamines in preserved sausages by solid-phase extraction-micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 985, n.1-2, p. 503-512, 2003.

SANTAMARIA, P.; ELIA, A.; SERIO, F.; TODARO, E. A survey of nitrate and oxalate in fresh vegetables. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.79, p.1882-1888, 1997.

SCANLAN, R.A. Formation and occurrence of nitrosamines in food. **Cancer Research**, v.43, p.2435-2439, 1983.

SCANLAN, R.A.; REYES, F.G.R. An update on analytical techniques for N-nitrosamines. **Food Technology**, v.79 p.95-99, 1985.

SCHALLER, U.; BAKKER, E.; SPICHIGER, U.E.; PRETSCH, E. Nitrite-selective microelectrodes. **Talanta**, v.41, p.1001-1005, 1994.

SEBRANEK, J. G.; FOX, J. B., Jr. A review of nitrite and chloride chemistry: Interactions and implications for cured meats. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 1169-1182, 1985.

SEN, N.P.; SEAMAN, S.; KARPINSKY, K. Determination of N-nitrosodimethylamine in nonfat dry milk. Collaborative study. **Journal Association Official Analytical Chemistry**, v.67, n.2, p. 232-236, 1984.

SEN, N.P., SEAMAN S.W., BURGESS, C., BADDOO P. A.; WEBER D., Investigation on the possible formation of N-nitroso-methylurea by nitrosation of creatinine in model systems and in cured meats at gastric pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.5088-5096, 2000.

SEN, N.P., SEAMAN S.W., PAGE, B.D. Rapid semi-quantitative estimation of N-nitrosodibutylamine and N-nitrosodibenzylamine in smoked hams by solid-phase microextraction followed by gas chromatography-thermal energy analysis. **Journal of Chromatography A**, v.788, p.131-140, 1997.

SEN, N.P.; BADDIOO, P.A; SEAMAN, S.W. Rapid and sensitive determination of nitrite in food and biological material by flow injection or high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. **Journal of chromatography A**, v.673, p.73-74, 1994.

SIDDIQI, M.; KUMAR, R.; FAZILI, Z.; SPIEGELHALDER, B.; PREUSSMANN, R. Increased exposure to dietary amines and nitrate in a population at high risk of oesophageal and gastric cancer in Kashmir (India). **Carcinogenesis**, v.13, p.1331-1335, 1992.

SIDES, A.; ROBARDS, K; HELLIWELL, S. Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v.19, n.5, p.322-329, 2000.

SILVA, M.; GALLEGGO, M.; VALCÁRCEL, M. Sequential atomic absorption spectrometric determination of nitrate and nitrite in meats by liquid-liquid extraction in a flow-injection system. **Analytica Chimica Acta**, v.179, p. 341-349, 1986.

SIU, D.C., HENSHALL, A. Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in meat products, **Journal of Chromatography A**, v.804, p.157–160, 1998.

SILVEIRA, N.V.V. Níveis de nitritos, nitratos e sorbatos em queijos curados comercializados na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.51, n.1-2. p.37-40, 1991.

SMITH, R.V., Nitrosamines: Occurrence, chemistry, toxicity and inhibition, **Chemical Times & Trends**, Jan, 1980.

STALIKAS, C.D.; KONIDARE, C.N.; NANOS, C.G. Ion chromatographic method for the simultaneous determination of nitrite and nitrate by post-column indirect fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v.1002, n.1-2, p. 237-241, 2003.

STEFANI, E.; RONCO, A.; BRENNAN, P.; BOFFETTA, P. Meat Consumption and Risk of Stomach Cancer in Uruguay: A Case-Control Study. **Nutrition and Cancer**, v.40, n.2, p. 103-107, 2001.

STOPES, C.; WOODWARD, L.; FORDE G.; VOGTMANN, H. The nitrate content of vegetable and salad crops offered to the consumer as from "organic" or "conventional" production systems. **Biological Agriculture and Horticulture**, v.5, n.3, p. 215-221, 1988.

SU, XIAO-LI; CHEN, P.; QU, XIAO-GE; WEI, WAN-ZHI; YAO, SHOU-ZHUO. A Novel Flow-Injection System for Simultaneous Determination of Nitrate and Nitrite Based on the Use of a Zinc Reductor and a Bulk Acoustic Wave Impedance Detetor. **Microchemical Journal**, v.59, n.3, p. 341-350, 1998.

SWANN, P.F. The Toxicology of Nitrate, Nitrite and N-nitroso Compounds. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.26, p. 1761-1770, 1975.

TAKATSUKI, K.; KIKUCHI, T. Determination of N-nitrosodimethylamine in fish products using gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, v.508, p.357-362, 1990.

TAKEDA, K.; FUJIWARA, K. Determination of nitrate in natural waters with the photo-induced conversion of nitrate to nitrite. **Analytica Chimica Acta**, v.276, n.1, p. 25-32, 1993.

TERRY, P.; TERRY, J.B.; WOLK, A. Fruit and vegetable consumption in the prevention of cancer: an update. **Journal of International Medicine**, v.250, p.280-290, 2001.

TRICKER A. R.; PREUSSMANN R. The occurrence of preformed N-nitroso compounds in food samples from a high risk area of esophageal cancer in Kashmir, India Maqsood Siddiqi. **Cancer Letters**, v.39, n.1, p.37-43, 1988.

TRICKER A.R., PREUSSMANN R. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanism and carcinogenic potential. **Mutation Research**, v.259, p.277-289, 1991.

TURRA, M.; AYUB, M.A.Z. Estudo da variação do teor de nitritos e nitratos em embutidos coloniais: possíveis implicações para a saúde pública. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.2, p.113-120, 1999.

U.S. EPA Pollution Prevention Strategy Fed. Regist. 56, p.7849-7864, 1991.

USHER, C.D., TELLING, G.M. Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: A critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.26, p.1793-1805, 1975.

van STADEN, J.F. Automated simultaneous determination of nitrate and nitrite by pre-valve reduction of nitrate in a flow-injection system. **Analytica Chimica Acta**, v.138, p.403-408, 1982.

VELASCO-ARJONA, A.; GARCÍA-GARRIDO, J.A.; QUILES-ZAFRA, M.D.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Full automated robotic method for the determination of chloride, nitrite and nitrate in cured meat products. **Talanta**, v.46, p. 969-976, 1998.

WALKER, R. Naturally occurring nitrate/nitrite in foods. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.26, p.1735-1742, 1975.

WALKER, R. Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. **Food Additives and Contaminants**, v.7, p. 717-768, 1990.

WALTERS, C.L.; SMITH, P.L.; REED, P.I. Pitfalls to avoid in determining N-nitroso compounds as a group. In: O'Neill, I.K.; Von Borstel, R.C.; Miller, C.T.; Long, J. and Bartsch, H., eds. N-nitroso Compounds: Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer (IARC Scientific Publications No.57), Lyon, **International Agency for Research on Cancer**, p. 113-119, 1984.

WALTERS, C.L. Reactions of nitrate and nitrite in foods with special reference to the determination of N-nitroso compounds. **Food Additives and Contaminants**, v.9, n.5, p.441-447, 1992.

WANG, H.; YANG W.; LIANG, SHU-CAI; ZHANG, ZHI-MIN; ZHANG, HUA-SHAN. Spectrofluorimetric determination of nitrite with 5,6-diamino-1,3-naphthalene disulfonic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 419, n.2, p.169-173, 2000.

WHO. Food Additives Series No 5. **Nitrates. nitrites, and N-nitroso compounds**. Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, Geneva, 1978.

WHO. Food Additives Series No 35. **Toxicological Evaluation of Certain Food Additives**. Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, Geneva, 1996.

WHO. Food Additives Series No 50. **Safety Evaluation of Certain Food Additives**. Fifty-ninth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, Geneva, 2003.

WU, Y.; CHEN, J.; OHSHIMA, H.; PIGNATELLI, B.; BOREHAM, J.; L.I., J.; CAMPBELL, T.C.; PETO, R.; BARTSCH, H. Geographic Association between Urinary Excretion of *N*-Nitroso Compounds and Oesophageal Cancer mortality in China. **International Journal of Cancer**, v. 54, p. 713-719, 1993.

XIMENES, M.I.N.; RATH, S.; REYES, F.G.R. Polarographic determination of nitrate in vegetables. **Talanta**, v. 51, p. 49-56, 2000.

YUE, X.; ZHANG, Z.; YAN, H. Flow injection catalytic spectrophotometric simultaneous determination of nitrite and nitrate. **Talanta**, v. 62, n.1, p. 97-101, 2004.

ZATAR, N.A.; ABU-EID, M.A.; EID, A.F. Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate using phosphomolybdenum blue complex. **Talanta**, v. 50, p. 819-826, 1999.

ZHAO,Z.; CAI,X. Determination of trace nitrite by catalytic polarography in ferrous ion thiocyanate medium. **Journal Electroanalytical Chemistry**, v.252, p.361-370, 1988.

ZHI-QI, Z.; LOU-JUN, G.; HAN-YING, Z.; QIAN-GUANG, L. Catalytic simultaneous spectrophotometric determination of nitrite nad nitrate with a flow injection system. **Analytica Chimica Acta**, v. 370, p. 59-63, 1998.

ZWICKENPFLUG, W. N-nitrosation of myosmine yields hpb (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) and NNN (N-nitrosonornicotine). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 392-394, 2000.