UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - PPGQUI

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE NITRITO EM PRODUTOS CÁRNEOS UTILIZANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO E DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA

ATANAEL DE JESUS SANTOS

JEQUIÉ-BA
DEZEMBRO DE 2019

ATANAEL DE JESUS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE NITRITO EM PRODUTOS CÁRNEOS UTILIZANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO E DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB - *Campus* de Jequié-BA, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Analítica pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Profª. Drª. Sulene Alves Araújo
Co-orientador: Professor Dr. Marcelo Eça Rocha

JEQUIÉ-BA
DEZEMBRO DE 2019

S237d Santos, Atanael de Jesus.
Desenvolvimento de metodologias para determinação de nitrito em produtos cárneos utilizando análise por injeção em fluxo e detecção espectrofotométrica / Atanael de Jesus Santos.- Jequié, 2018.
74f.

(Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia- UESB, sob orientação da Profa. Dra. Sulene Alves Araújo e coorientação do Prof. Dr. Marcelo Eça Rocha)

1.Nitrito 2.FIA 3.Produtos cárneos 4.Otimização I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 664.9

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

Atanael de Jesus Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **01/11/2018.**

Comissão Examinadora:

Sulene Alves de Araújo

Profa. Dra. Sulene Alves de Araújo
(UNESP, São Paulo-SP, 2003)

Prof. Dr. Marcelo Eça Rocha
(UFBA, Salvador-BA, 2016)

Valfredo Azevedo Lemos
(UFBA, Salvador-BA, 2001)

Marcos de Almeida Bezerra

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra
(UFBA, Salvador-BA, 2006)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Adenilson e Carmozina. Eu amo-os de todo meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por todas as obras e maravilhas que tem realizado em minha vida; por ter me dado forças, sabedoria e capacidade para realizar tal trabalho. Não foi fácil chegar até aqui, mas creio que seria mais difícil ainda sem a presença e ajuda Dele. Obrigado Senhor, te amo!

Em segundo lugar, agradeço à minha família, em especial, ao meu pai e minha mãe por todo apoio; pelo amor e carinho incondicional; por ter me criado nos caminhos do Senhor e ter feito o possível para me dar uma boa vida. Amo vocês, meus pais! Amo vocês também, meus irmãos.

Agradeço a todos os meus colegas de curso. Foi muito bom estar com vocês. Obrigado pela parceria.

À professora Sulene que me orientou neste trabalho, foi bastante paciente e compreensiva. Não tenho palavras para agradecer, então quero dizer, que oro a Deus por sua vida professora, se hoje estou obtendo este título, é graças a ti também. Obrigado por ser assim como és, te levarei para sempre no coração.

Ao professor Valfredo Lemos que me apresentou a análise em fluxo, e me emprestou o sistema e me orientou nos mecanismos.

Ao meu co-orientador, professor Marcelo Eça, e também à professora Anaildes.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Química, professor Djalma e Cléber, que têm feito um trabalho de excelência, e têm sempre se dedicado aos alunos do programa.

Aos meus professores da pós-graduação, aprendi muito com todo eles.

Á CAPES, pela bolsa de estudo.

Agradeço aos meus amigos e irmãos em Cristo por sempre confiar em mim. Obrigado pelas orações, carinho, e principalmente, pela amizade.

“Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus. ”
(BÍBLIA SAGRADA – Romanos 8.28)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo do nitrogênio. 18

Figura 2 - Oxidação do Fe (II) a Fe (III) da hemoglobina pela ação do nitrito. 21

Figura 3 - Gradiente de concentração (a); Sinal analítico de concentração em função do tempo (b). 23

Figura 4 - Configurações para análise de injeção em fluxo: (a) em linha única; (b) duas linhas (amostra e reagente) com ponto de confluência; (c) reagentes pré-misturados por confluência de duas linhas antes da injeção da amostra em linha única; (d) reagentes pré-misturados por confluência de duas linhas antes de entrar em confluência de linha única com a amostra pré-injetada; (e) amostra pré-injetada antes da confluência de cada reagente separadamente ao longo da linha. Sendo, P (bomba peristáltica); S (amostra); B (bobina de reação); D (detector) e W (descarte). 25

Figura 5 - Reação entre sulfanilamida, nitrito e NED, para formação do azo composto. 27

Figura 6 - Representação da reação entre o violeta de metileno e o nitrito. 27

Figura 7 – Fluxograma da metodologia de extração dos íons nitrito da matriz cárnea em amostra de linguiças do tipo frescal. Os números de 1 a 13 indicam a ordem em que cada etapa é executada. 32

Figura 8 – Esquema do sistema de análise de injeção em fluxo utilizado neste trabalho. a) Pré-injeção dos reagentes (R1 – NED) e (R2 – sulfanilamida) na alça. b) amostra (S) sendo utilizada como solução carreadora, responsável por carregar os reagentes à bobina de reação, e posteriormente ao detector (D), sendo os resíduos liberados no descarte (W). 35

Figura 9 – Curva de nível gerada pelo processo de otimização da metodologia de extração de íons nitrito da matriz cárnea, utilizando como tetraborato de sódio como solução extratora. . 38

Figura 10 - Superfície de resposta 3D gerada pelo processo de otimização da metodologia de extração de nitrito de matriz cárnea, utilizando tetraborato de sódio como solvente extrator. 39

Figura 11 – Esquematização da coluna de redução de cádmio suportado em zinco metálico. 41

Figura 12 - Otimização do tamanho da coluna de redução. 42

Figura 13 - Relação entre a concentração de nitrato e o percentual de redução. 43

Figura 14 - Comportamento da coluna mediante repetições sucessivas sem ativação da mesma entre cada experimento. 45

Figura 15 – Curva de nível gerada pelo processo de otimização do sistema de quantificação íon nitrito. 48

Figura 16 - Superfície de resposta 3D gerada pelo processo de otimização do sistema de quantificação do íon nitrito. 49

Figura 17 – Picos de máxima absorção com varredura de 400 a 800 nm para concentrações de nitrito variando de 0,04 a 1,12 µg/mL. 51

Figura 18 - Curva de calibração para concentração de nitrito variando de 0,04 a 1,12 µg/mL. 52

Figura 19 – Curva intervalo linear dinâmico. 53

Figura 20 – Avaliação do efeito matriz. 54

Figura 21 - Otimização da vazão da amostra, utilizada também como solução carreadora, para quantificação de nitrito via sistema FIA. 58

Figura 22 - Relação entre a absorbância e as vazões de amostra e dos reagentes em pregados no sistema FIA. 59

Figura 23 -Relação entre o tamanho da alça e a absorbância no sistema FIA. 61

Figura 24 - Otimização razão NED/SULFANILAMIDA no sistema FIA. 63

Figura 25 - Otimização das concentrações de NED e Sulfanilamida no sistema FIA. 65

Figura 26 - Curva de calibração para o sistema FIA. 66

Figura 27 - Curva intervalo linear dinâmico para o sistema FIA. 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento estatístico Composto Central para otimização da metodologia de extração de íons nitrito de amostras cárneas. 33

Tabela 2 - Planejamento estatístico Composto Central para otimização da metodologia de quantificação do íon nitrito. 34

Tabela 3 – Matriz planejamento composto central para duas variáveis na otimização da metodologia de extração do íon nitrito. 37

Tabela 4 – Teste de adição e recuperação aplicado ao sistema otimizado de extração de íons nitrito de matriz cárnea. 40

Tabela 5 – Resultados do processo de otimização do tamanho da coluna redutora. 41

Tabela 6 - Resultados do teste de eficiência da coluna redutora de cádmio e zinco. 43

Tabela 7 - Resultados encontrados no ensaio de adição e recuperação do sistema de redução otimizado. 44

Tabela 8 - Comportamento da coluna mediante 8 repetições sucessivas ou 24 experimentos sem ativação da coluna redutora. 45

Tabela 9 - Matriz planejamento composto central para duas variáveis no processo de otimização do sistema de quantificação do íon nitrito. 47

Tabela 10 – Dados obtidos para a construção da curva de calibração e avaliação do efeito matriz, utilizando amostras de linguiça de carne, frango e mista. 50

Tabela 11 - Teste-F: duas amostras para variâncias. 54

Tabela 12 - Teste t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes. 55

Tabela 13 – Estudo de seletividade. 55

Tabela 14 – Parâmetros analíticos do método. 56

Tabela 15 - Resultados encontrados no processo de otimização das vazões de amostras, mantendo as concentrações de sulfanilamida e NED fixas. 57

Tabela 16 - Resultados obtidos no processo de otimização do tamanho da alça de amostragem no sistema FIA. 60

Tabela 17 - Parâmetros instrumentais utilizados no sistema FIA. 61

Tabela 18 - Resultados obtidos no processo de otimização das melhores proporções entre as concentração NED/Sulfanilamida no sistema FIA. 62

Tabela 19 - Resultados do processo de otimização das concentrações de NED e Sulfanilamida no sistema FIA. 64

Tabela 20 - Resultados da curva de calibração no sistema FIA. 65

Tabela 21 - Comparação entre os parâmetros da metodologia convencional e do sistema FIA. 68

Tabela 22 - Determinação de nitrito em amostras de linguiça do tipo frescal pelo método convencional e pelo sistema FIA. 68

RESUMO

O presente trabalho trata-se de um estudo voltado para a otimização da determinação e quantificação de íons nitrito, em amostras de produtos cárneos, com aplicação do sistema de análise de injeção em fluxo (FIA) acoplado à técnica espectrofotométrica. Neste estudo, foi abordada a otimização da extração à quente em sistema aberto do íon nitrito da matriz cárnea, utilizando 10 mL do agente extrator (tetraborato de sódio) e 75 minutos de tempo de extração; a otimização da metodologia de quantificação para o sistema em batelada, e em linha, e posterior comparação entre ambos, utilizando como reagentes sulfanilamida e N-(1-naftiletilenodiamino)bicloridrato (NED); e em paralelo, foi abordada a otimização para determinação de nitrato através de redução a nitrito via coluna de cádmio e zinco. Os limites de detecção e quantificação de ambos os sistemas foram, respectivamente, 10 e 30 µg/L ou 1,1 e 3,3 mg/kg (batelada) e 2 e 5 µg/L ou 0,12 e 0,37 mg/kg (linha). Nos testes realizados com as amostras de linguiça do tipo frescal (carne, frango e mista), foram encontradas concentrações de nitrito de 277,4 mg/kg, acima do teor máximo recomendado pela ANVISA.

Palavras-chave: Nitrito. FIA. Produtos cárneos. Otimização.

ABSTRACT

The present work is a study aimed at optimizing the determination and quantification of nitrite ions in meat product samples, using the flow injection analysis (FIA) system coupled to the spectrophotometric technique. In this study, the optimization of the open system hot extraction of the nitrite ion of the meat matrix was approached, using 10 mL of the extracting agent (sodium tetraborate) and 75 minutes of extraction time; the optimization of the quantification methodology for the batch and in-line system and subsequent comparison between them, using sulfanilamide and N- (1-naphthylethylenediamine) bichlorohydrate (NED) as reagents; and in parallel, the optimization for nitrate determination through nitrite reduction via cadmium and zinc column was discussed. The detection and quantitation limits of both systems were respectively 10 and 30 µg/L or 1.1 and 3.3 mg/kg (batch) and 2 and 5 µg/L or 0.12 and 0.37 mg/kg (line). In the tests carried out with the fresh sausage samples (meat, chicken and mixed), nitrite concentrations of 277.4 mg/kg were found, above the maximum level recommended by ANVISA.

Keywords: Nitrite. FIA. Meat products. Optimization.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 15
Capítulo 1 – REFERENCIAL TEÓRICO 17
1.1 Nitrogênio e seus derivados 17
1.2 Toxicidade relacionada a nitratos e nitritos 20
1.3 Sistema de Análise de Injeção em Fluxo 21
1.4 Métodos utilizando técnica espectrofotométrica para determinação de nitrato e nitrito 26
1.4.1 Nitrito 26
1.4.2 Nitrato 28
Capítulo 2 - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL 31
2.1 Objetivo geral 31
2.1.1 Objetivos específicos 31
2.2 Otimização de metodologia de extração de íons nitrito 31
2.3 Otimização da metodologia de redução de nitrato a nitrito 33
2.4 Otimização da metodologia convencional de quantificação de íons nitrito 34
2.5 Otimização de metodologia de quantificação de íons nitrito via FIA 35
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES 37
3.1 Otimização da metodologia convencional de extração 37
3.2 Otimização da metodologia de redução de nitrato a nitrito 40
3.3 Otimização da metodologia de quantificação do íon nitrito 46
3.4 Otimização da metodologia de quantificação de nitrito por FIA 56
CONSIDERAÇÕES FINAIS 70
REFERÊNCIAS 71

INTRODUÇÃO

Atualmente, muitos trabalhos tratam exclusivamente da determinação e quantificação de diversas substancias em produtos alimentícios [1]. Isto torna-se mais interessante e essencial quando há um iminente risco de contaminação, intoxicação ou outros tipos de problemas relacionados às substâncias em estudo.

Os riscos relacionados a essas substâncias, em muitos casos, são de conhecimento dos órgãos regulamentadores, que tentam, à medida do possível, intervir de maneira efetiva, a fim de evitar o excesso, ou até mesmo, a presença de diversas substâncias em produtos consumíveis. Todavia, em muitos casos, os fabricantes ou comerciantes, ignoram as normas estabelecidas pelos órgãos regulamentadores, e isso pode gerar sérios problemas, e por isso também, a necessidade de se fazer esses tipos de estudos analíticos.

No caso dos produtos cárneos, que são um dos produtos mais consumidos (talvez não em termos de quantidade, mas de frequência) pela sociedade, exceto pelos adeptos da culinária vegetariana e vegana, seria um dos alimentos que necessitaria de um acompanhamento especial nessa área de quantificação de substâncias tóxicas ou nocivas à saúde humana.

Algumas dessas substâncias são os íons nitrito e nitrato. Eles são adicionados aos produtos cárneos para preservar o sabor e a textura, principalmente em embutidos, como salsicha e linguiças. O nitrato em si não causa dano ao ser humano, porém, ele pode ser reduzido a nitrito através de enzimas redutoras contidas no trato intestinal, e este, sim, já tem um efeito nocivo em relação à saúde humana. Ele pode provocar câncer de mama em mulheres; câncer de estômago em adultos; falta de ar, principalmente em crianças que tem uma vulnerabilidade maior em relação aos adultos; e também uma doença chamada metahemoglobinemia, que geralmente acontece em crianças de 0 a 2 anos de idade; etc.

Tendo consciência desses problemas referentes ao consumo de alimentos que tenha em sua estrutura íons nitrato e nitrito, o ministério da saúde e os outros órgãos responsáveis pela regulamentação e fiscalização dos produtos, adotaram uma legislação, regulamentando que, em produtos cárneos, o teor máximo de nitrito e nitrato seriam, respectivamente, 150 e 300 mg/kg [2], [3]. Todavia, considerando que o teor máximo aceitável por dia, IDA (Ingestão Diária do Aceitável) que é o mesmo estabelecido pela Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAD/WHO), no Brasil e em todo Mercosul, que cada pessoa pode ingerir é de no máximo, para nitrito, 0,06 mg/kg, e para nitrato, 3,7 mg/kg de peso corpóreo [4]. Então, neste caso, uma pessoa de 60 kg pode no máximo ingerir por dia 3,6 mg

de nitrito e 222 mg de nitrato. Porém, se essa pessoa, ingere em média 240 gramas de carne (bovina, suína e frango) por dia [5], então o teor máximo de nitrito e nitrato nessa carne pode ser de 15 mg/kg e 925 mg/kg, respectivamente.

Contudo, deve-se levar em consideração que o íon nitrato pode ser reduzido a nitrito no trato gastrointestinal. Então, apesar do nitrato não causar dano ao corpo, deve-se evitar ingerir quantidades exageradas, justamente por conta desta redução que ocorre.

Este trabalho consiste na otimização do processo de extração (libertação do nitrito e nitrato da matriz amostral), determinação e quantificação do íon nitrito (utilizando os reagentes NED (N-naftiletilenodiamino) e sulfanilamida, produzindo um complexo colorido (róseo) que é analisado no espectrofotômetro na região do visível a 543 nm) em produtos cárneos; otimização do sistema de Injeção em Fluxo para quantificação do íon nitrito; e comparação final entre o sistema de quantificação em batelada versus em linha.

Em termos de estrutura por composição deste trabalho escrito, temos: capítulo 1, que aborda os referenciais teóricos envolvidos na produção deste trabalho; Capítulo 2, que consiste na parte metodológica deste trabalho; Capítulo 3, que apresenta os resultados e suas possíveis discussões; considerações finais; e referências.

Capítulo 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 NITROGÊNIO E SEUS DERIVADOS

O ‘nitrogênio’, nome dado por Jean-Antoine-Claude Chaptal em 1790, e descoberto por Rutherford em 1772, é o elemento mais abundante na atmosfera em termos de N_2, representando cerca de 78% dela. Entretanto, o N_2 é relativamente baixo na crosta terrestre, apresentando um teor na ordem de 19 ppm (19 g por tonelada) [6]. Por conta dessa pequena disposição em solos, e levando em consideração que ele é um dos elementos fundamentais no metabolismo de plantas (utilizado na síntese de proteínas e outros compostos orgânicos, como: aminoácidos, nucleotídeos e coenzimas), desde a antiguidade, os povos vem implementando técnicas para suprir as necessidades de nitrogênio nas lavouras, através de fezes ou cultivos de leguminosas, e atualmente, tem-se suprido essas necessidades através da utilização de fertilizantes químicos [7].

Porém, vale ressaltar que, apesar da grande importância destas técnicas de suprimento para a lavoura ou cultivo de plantas, o excesso pode provocar sérios problemas ambientais, uma vez que promove perturbação global e do ciclo do nitrogênio [8], [9].

A principal reserva de nitrogênio no solo é a matéria orgânica (onde, aproximadamente 98% de nitrogênio, estão como derivados orgânicos), que tem grande significado para o suprimento de nutrientes (para as plantas) através de processos químicos e biológicos. E os outros 2%, estão distribuídos entre derivados inorgânicos, como: amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) [7].

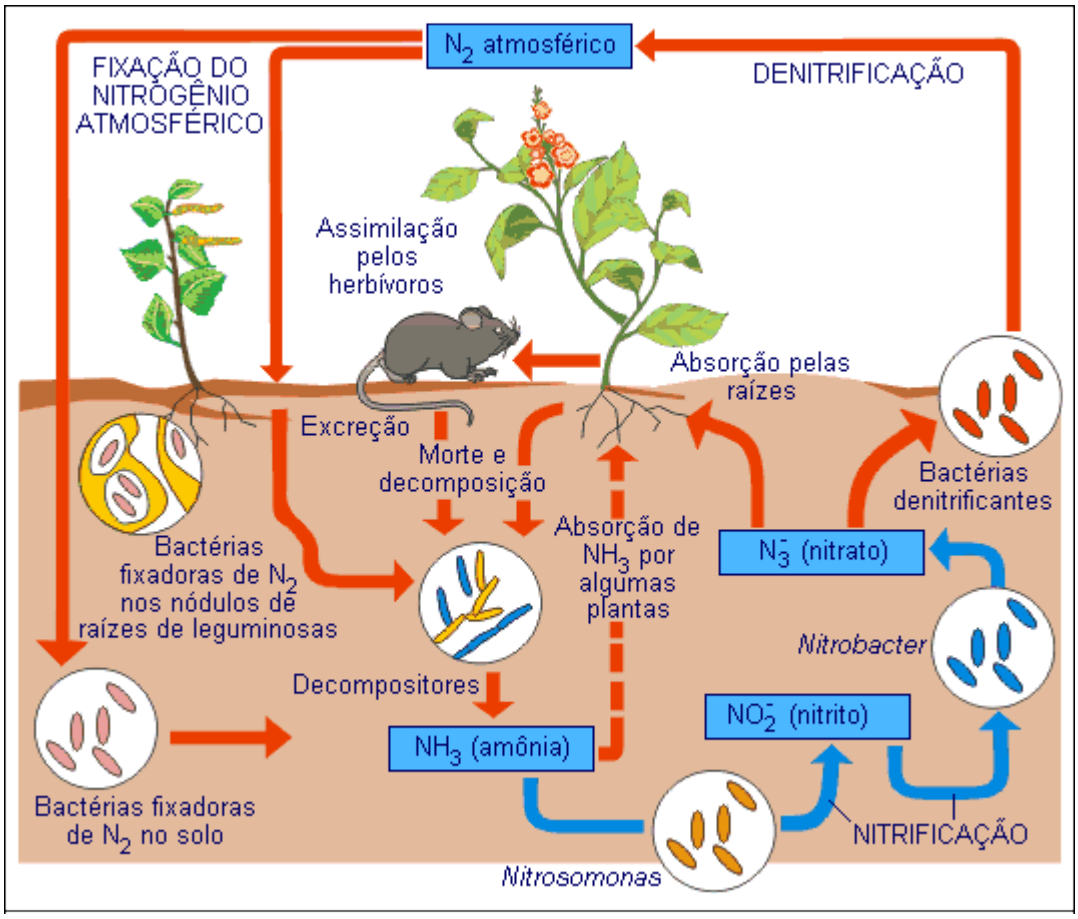
Apesar da disposição do nitrogênio ser de 78% na atmosfera, por conta das fortes ligações que promove a estabilidade dessa molécula, o N_2 não pode ser assimilado pelas plantas. Um dos processos para promover essa assimilação é através de grandes valores de temperatura e pressão, que só é possível apenas em indústrias (fixação industrial), chamado de processo Haber-Bosch (Equação 1) com temperatura que variam 400 a 600ºC e pressão de 100 a 200 atm. Um processo semelhante também se dá através de um sistema enzimático apropriado (fixação biológica) (Equação 2). Nesses dois processos o N_2 é convertido em outras substâncias que já são facilmente assimiladas pelas plantas ou organismo que dependem de nitrogênio [10].

Equação 1: $N_2 + 3\ H_2 \rightarrow 2\ NH_3$

Equação 2: $N_2 + 16\ ATP + 8\ e^- + 8\ H^+ \rightarrow 2\ NH_3 + H_2 + 16\ ADP + 16\ Pi$

No caso da fixação biológica, ela ocorre a temperatura ambiente por meio de uma enzima chamada nitrogenase, conforme a representação do ciclo do nitrogênio na Figura 1.

Figura 1 - Ciclo do nitrogênio.



FONTE: EducaBras

Como mostra o ciclo do nitrogênio, os compostos de nitrogênio que são assimilados pelas plantas são: nitrato, nitrito e amônio, que dependo do tipo de solo, são oxidados (nitrificação) ou reduzidos (denitrificação).

O íon amônio é uma das formas de nitrogênio inorgânico dissolvido na água do mar, proveniente, em sua maioria, de fertilizantes e da degradação de resíduos de origem animal ou vegetal. Um grande aumento na sua concentração pode ser tóxico para os peixes e outras espécies marinhas [11]. Em ambientes aeróbicos, como na superfície de lagos, o nitrogênio pode existir na forma de íon nitrito e até mesmo nitrato, pois a presença de oxigênio promove a oxidação do íon amônio, porém, em ambientes anaeróbios, existem apenas em forma de amônio [1].

Os íons nitrato e nitrito são os derivados mais comuns do nitrogênio, e também os mais estáveis. Eles apresentam estruturas com nitrogênio em estado de oxidação (+3) e (+5), respectivamente. Eles são íons poliatômicos, constituídos de nitrogênio (N) e oxigênio (O), de carga pequena (-1), e apresentam, relativamente, uma elevada entropia em água, o que significa dizer que eles têm boa solubilidade.

A versatilidade físico-química dos nitratos (NO_3^-) e nitritos (NO_2^-) tem assegurado as suas utilizações dentro de uma multiplicidade de processos industriais e produtos manufaturados [12], [13]. Sua ação antimicrobiana tem sido reconhecida há séculos e ainda é usado para a preservação de derivados de carne [14]. Essa propriedade de preservação deve-se ao fato dos nitritos e nitratos atuarem na prevenção do crescimento do Clostridium botulinum, e além de preservar, proporcionam a cor rósea dos produtos cárneos, o sabor típico de carnes curadas, além de possuírem efeito antioxidante [15], [16].

Além de serem encontrados em produtos cárneos por processos de adição de sais de cura, são também encontrados nas verduras e na água, principalmente em áreas rurais. Muitos autores têm relatado o alto nível de nitrato e nitrito encontrados na água de consumo da população e nas plantas, dentre elas as verduras e legumes [17], [18].

Apesar do grande número de produtos que são dependentes destes íons, são as suas relações com as questões ambientais e de saúde que tem atraído o interesse da comunidade científica [9].

Sérios problemas estão associados aos nitratos e nitritos, no que diz respeito aos impactos ambientais, saúde animal, saúde humana e impacto econômico [19]. Para evitar esses problemas, a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)/MAPA através da portaria nº 1004 de 11 de dezembro de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária estabeleceu um limite máximo de 150 mg/kg de nitrito (de sódio ou potássio) e 300 mg/kg de nitrato (de sódio ou

potássio) em carnes ou produtos cárneos. No caso do uso simultâneo de nitrito e nitrato a soma das suas concentrações não pode ser superior a 150 mg/kg [20].

1.2 TOXICIDADE RELACIONADA A NITRATOS E NITRITOS

O enriquecimento excessivo das águas com nutrientes, como o nitrato, tem promovido impactos ambientais como o fenômeno chamado de eutrofização, favorecendo assim a proliferação exagerada de algas, que por sua vez, altera o ambiente subaquático, diminuindo a possibilidade de penetração da luz e reduzindo a disponibilidade de oxigênio dissolvido, aumentando assim a mortalidade de muitos peixes e outros organismos [19]. E muitos problemas ainda podem ocorrer com animais ruminantes como: bovinos e ovinos, e também com alguns monogástricos, pois estes possuem certas bactérias no trato digestivo que convertem nitratos a nitrito, causando envenenamento e por consequência à morte [21].

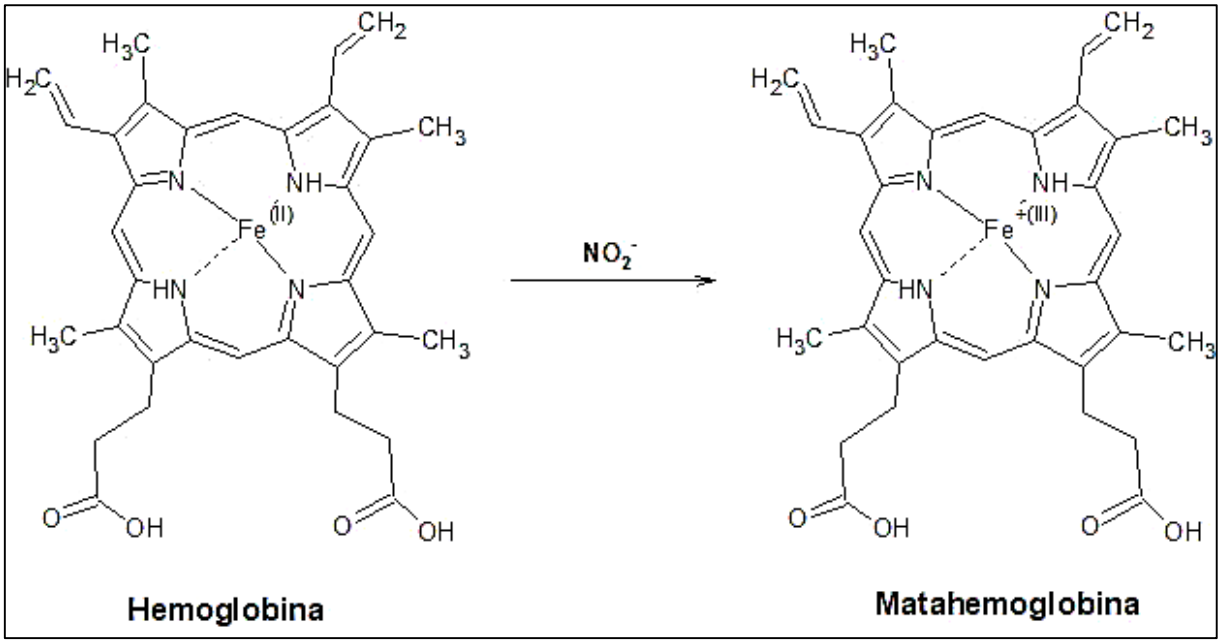
O excesso de íon nitrato em água potável é preocupante, pois pode causar em recém-nascidos, a síndrome do bebê azul; e em adultos, conforme pesquisas, pode ser responsável por causar câncer de estômago, e aumentar a probabilidade de câncer de mama em mulheres, além provocar falta de ar, fadiga, etc. [22], [23].

O nitrato em meio ácido (estômago) é convertido em nitrito, conforme a Equação 3.

Equação 3: $NO_3^-(aq) + 2H^+(aq) + 2e^- \rightarrow NO_2^-(aq) + H_2O$

A síndrome do bebê-azul é chamada de metahemoglobinemia, que se dá pela oxidação do Fe (II) da hemoglobina, pelo nitrito, a Fe (III), formando assim a metahemoglobina, conforme a Figura 2, que é um composto incapaz de transportar oxigênio para as células, provocando assim a insuficiência respiratória (causa da pele azulada) [24].

Figura 2 - Oxidação do Fe (II) a Fe (III) da hemoglobina pela ação do nitrito.



FONTE: Própria.

A síndrome se dá em crianças, pois elas são suscetíveis à formação da metahemoglobina, e isso por várias questões: da diferença de ingestão de líquidos versus peso corporal; pH estomacal; as crianças tem uma grande quantidade de hemoglobina fetal, Hemoglobina (F), que pode ser facilmente convertida a metahemoglobina, em relação à Hemoglobina adulta (Hemoglobina A); entre outras [24].

Muitos casos já foram registrados de crianças recém-nascidas, e até mesmo, crianças de 2 a 7 anos com cianose, por ingestão de água; leite materno; leite sintético e legumes. E muitos casos de adultos que sofreram algum tipo de problema relacionado a nitritos por ingestão de água e alimentos, principalmente nas zonas rurais. Na década de 1930, na Alemanha, muitas pessoas morreram devido à intoxicação por ingestão de produtos cárneos contendo sais de cura, foi a partir daí que sentiu a necessidade de promover uma legislação para controlar as quantidades de cada agente adicionado às carnes; e isso percorreu por toda a Europa, chegando também em todos os outros continentes e países [25].

1.3 SISTEMA DE ANÁLISE DE INJEÇÃO EM FLUXO

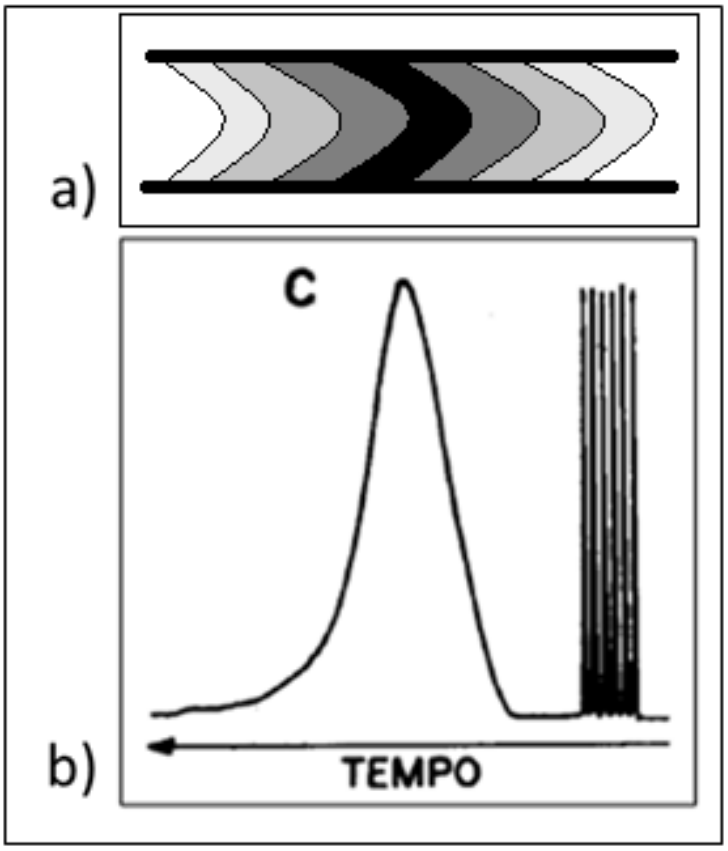
Nas análises de nitrito e nitrato, vários métodos têm sido desenvolvidos, utilizando-se muitas técnicas diferentes. Dentre elas estão as técnicas cromatográficas; eletroforéticas; eletroanalíticas; potenciométricas; eletrodo íon seletivo; a voltametria de pulso diferencial e

espectrofotometria, sendo que todas elas podem ser utilizadas com adaptação do sistema de análise de injeção em fluxo (FIA) [24], [26]. Porém, deve-se fazer um balanço geral a respeito da viabilidade tanto da técnica quanto do método, a fim de escolher o que for mais viável, do ponto de vista financeiro, de aplicação e de resultados. A escolha feita, foi a técnica espectrofotométrica, por ser de boa sensibilidade, baixo custo e fácil manuseio [26], e a possibilidade de acoplamento ao sistema FIA aumenta a velocidade analítica do sistema e diminui a quantidade amostras e reagentes.

Os primeiros sistemas de Análises por Injeção em Fluxo foram descritos em 1975 e 1980 por Ruzicka e Hansen [27], [28]. E chegou ao Brasil em 1976, trazida pelo Dr. Jaromir Ruzicka, que esteve no Brasil como perito da Agência Nacional de Energia Atômica, assessorando o laboratório de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP) [28], [29]. E desde então, o emprego desta tecnologia no campo cientifico tem crescido ao longo do tempo, chegando há cerca de, 20 anos depois, mais de 4.000 artigos distribuídos em 40 países; 5 livros publicados; e no Brasil, cerca de 15% das comunicações em Química Analítica, empregava o sistema de análise em fluxo [28], [29].

O sistema FIA baseia-se na injeção de uma alíquota da amostra aquosa (onde o volume é definido pelas dimensões da alça de amostragem) em um fluxo de uma solução carreadora (que pode ser um ou mais reagentes); a solução carreadora é aquela que conduz a amostra até ao detector [27], [30]. Neste sistema, inúmeras operações podem ser desenvolvidas antes que a amostra chegue ao detector, como: adição de reagentes; diluição; misturas; reações; extração; aquecimento; entre outras [31]. O sinal que chega ao detector é transiente, como mostra a Figura 3b, uma vez que a dispersão da amostra causada pelo fluxo do carreador promove um gradiente de concentração (Figura 3a) [30].

Figura 3 - Gradiente de concentração (a); Sinal analítico de concentração em função do tempo (b).



FONTE: LEMOS, 2017; REIS, 1996.
NOTA: Figura modificada.

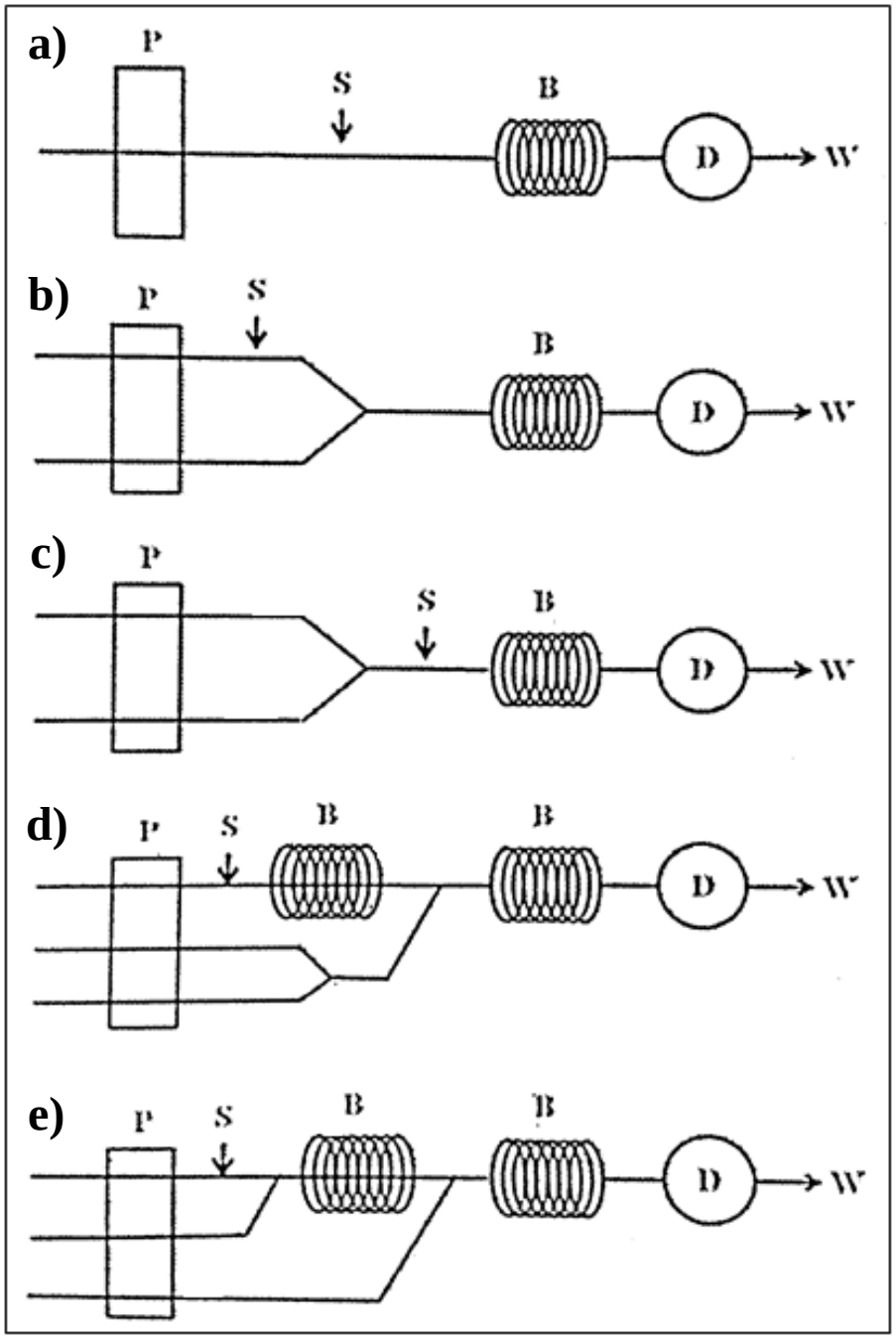
A dispersão promove a reação ou interação da amostra com o reagente, enquanto a mesma é transportada até ao detector. Este fator ainda pode ser afetado pela magnitude de sinal, devido ao aumento ou diminuição do percurso analítico e/ou do tempo de residência da amostra no percurso [28], [29].

Quando há reação química em desenvolvimento, o percurso analítico deve ser considerado em função da cinética da reação. O percurso determina o tempo de reação, que pode ser ajustado pelo comprimento da bobina de reação e da vazão da amostra e do reagente. E isso vai determinar a velocidade analítica do sistema (número de determinações por hora). Porém, nem sempre será possível adquirir um percurso que seja compatível com a cinética da reação; e até mesmo, em alguns casos o seguimento de um percurso adequado à cinética da reação promove na diminuição da velocidade analítica, então deve-se analisar o que é válido para o sistema. Como se trata de um sistema em fluxo a vazão constante, o tempo de trânsito

entre o injetor e o detector é igual tanto para amostras quanto para padrões, podendo assim efetuar as leituras sem mesmo completar a reação; mantendo assim uma velocidade analítica boa, mesmo com um percurso inadequado à cinética da reação [29].

Em um sistema FIA, a velocidade analítica varia de 60 a 300 leituras por hora [29], [30], [31]. E alguns componentes são necessários, como: bomba peristáltica; válvulas rotatórias (inserção de amostras); tubos condutores; conectores; tubos condutores flexíveis; bobina de reação; detector; etc. [30]. Com esses componentes, algumas configurações do sistema se torna possível, conforme a Figura 4.

Figura 4 - Configurações para análise de injeção em fluxo: (a) em linha única; (b) duas linhas (amostra e reagente) com ponto de confluência; (c) reagentes pré-misturados por confluência de duas linhas antes da injeção da amostra em linha única; (d) reagentes pré-misturados por confluência de duas linhas antes de entrar em confluência de linha única com a amostra pré-injetada; (e) amostra pré-injetada antes da confluência de cada reagente separadamente ao longo da linha. Sendo, P (bomba peristáltica); S (amostra); B (bobina de reação); D (detector) e W (descarte).



FONTE: LEMOS, 2017.

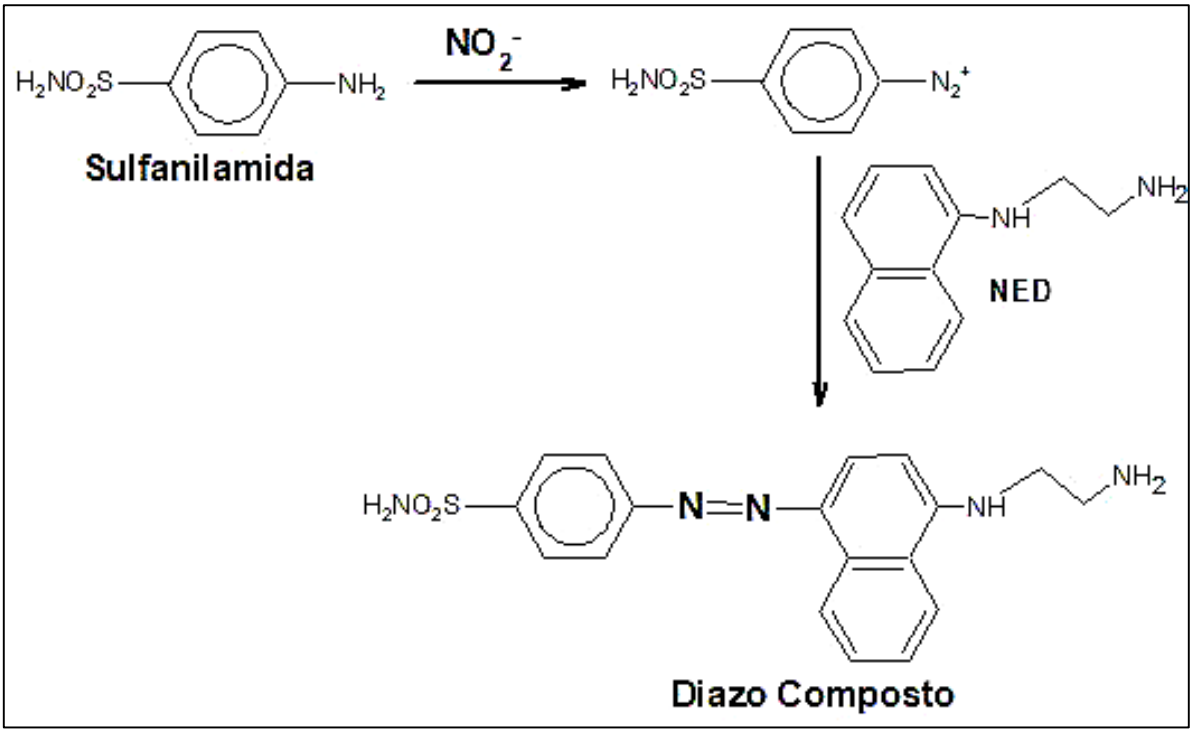
São chamados de FIA normal, o sistema com a pré-injeção de amostras. Porém, o sistema pode funcionar também com a pré-injeção dos reagentes, e utilizando a amostra como solução carreadora, FIA reverso. A utilização de um deles depende da sensibilidade causada pela dispersão seja dos reagentes ou da amostra [30], neste trabalho, uma maior sensibilidade foi promovida utilizando o FIA reverso, com pré-injeção dos reagentes, e utilizando a amostra como carreador.

1.4 MÉTODOS UTILIZANDO TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO

1.4.1 Nitrito

A determinação do nitrito, empregando a técnica espectrofotométrica, pode ser realizada pelo método chamado de ***diazotação da sulfanilamida***, que foi proposto por Griess em 1879, onde o nitrito reage em meio ácido com a sulfanilamida, e depois com o n-naftiletilenodiamino e forma um composto de coloração vermelho intenso, chamado de azo-composto [32], [33], [34], conforme Figura 5. Esta metodologia foi escolhida nos testes realizados neste trabalho.

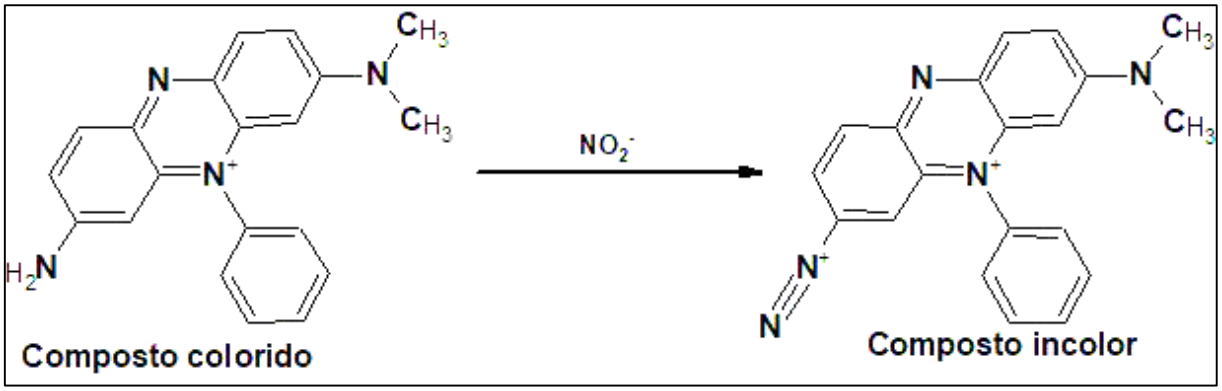
Figura 5 - Reação entre sulfanilamida, nitrito e NED, para formação do azo composto.



FONTE: Própria

Outro método se dá através da análise direta do nitrito em diferentes matrizes a partir da reação entre o nitrito e o violeta de metileno. Nesta reação, conforme Figura 6, ao contrário das demais, a absorbância de diminui com o aumento da concentração de nitrito [35].

Figura 6 - Representação da reação entre o violeta de metileno e o nitrito.



FONTE: Própria.

O nitrito também pode ser determinado no ultravioleta em comprimento de onda 350 nm [34], [36], porém, deve-se levar em consideração alguns aspectos como interferência de outros íons e também de matéria orgânica [36].

1.4.2 Nitrato

O nitrato pode ser "determinado na região do ultravioleta", como aborda o Stantard Methods for the Examination of Water and Wastewater (SMEWW), e também na região visível do espectro eletromagnético, empregando-se vários métodos que desenvolvem cor através da reação do íon nitrato com alguns reagentes. Algumas vantagens e desvantagens da utilização das regiões ultravioleta e visível estão descritas nos subitens a seguir.

A determinação do nitrato por espectrofotometria pode ser efetuada pelo método direto ou indireto. O método direto refere-se a determinação e quantificação de uma determinada substância, sem a necessidade de modificá-la quimicamente, exceto no caso das formações de complexos, que são fatores importante para análise na região do visível. Em contrapartida, o método indireto baseia-se na análise de uma substância quimicamente modificada.

1.4.2.1 Método direto

O recomendado pela SMEWW, é ***o método do salicilato*** que consiste na formação, em meio ácido e com aquecimento, dos íons nitrônio (NO_2^+), e este reage com salicilato, em meio básico, formando um composto nitrobenzóico de coloração amarelada [32], [37]. Porém, este método, partindo do primeiro passo no sentido de determinação e quantificação, demora em média, para cada triplicada de uma amostra, cerca de 4 horas de análise (formação de íons nitrônio – formação do complexo – quantificação).

O recomendado pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC), é o ***método da brucina*** que baseia-se na reação entre a brucina e o nitrato em meio ácido e com aquecimento, para a formação de composto colorido, que pode ser analisado em 410 nm. Porém, a brucina é uma substância tóxica, que pode provocar irritações nos olhos, nariz e garganta, e no caso de ingestão ou inalação, pode provocar vômitos ou náuseas [37], [38], [39], [40].

Outro método direto é do ***ultravioleta*** que consiste em analisar diretamente o nitrato sem utilização de reagentes, através da sua absorção no espectro do ultravioleta. Neste caso, a determinação de nitrato pode ser feita, baseados nos trabalhos de HOATHER e RAKCHAM; GOLDMAN e JACOBS; ARMSTRONG em torno de 210-230 nm, porém com algumas compensações devido as interferências da matéria orgânica que absorve em 275 nm [36]. Existem interferências também com outros ânions e cátions, como: cloreto; nitrito; ferro (III);

etc. O trabalho de HEANES propõe a redução de interferências, por meio do emprego do carvão ativado, mas não é efetivo na eliminação da matéria orgânica [41].

Outro trabalho, desenvolvido WETTERS e UGLUM, promove a determinação de nitrato em 300 nm em pH 5, porém, neste comprimento de onda, o íon nitrito também absorve. Então como o nitrato não absorve em 350 nm e o nitrito sim, o estudo sugeriu encontrar a concentração de nitrato através da subtração da absorvância em 300 nm pela absorbância em (350 nm dividida por 2,5) [34], [36]. Porém, é necessária a remoção dos interferentes, sejam eles orgânicos ou inorgânicos [34]. Na análise no UV, a quantificação é feita de modo direto (sem promoção de cor ao meio). Porém, há algumas implicações, como por exemplo: não há especificidade, uma vez que uma série de interferentes (matriz amostral rica em substâncias) que absorvem na mesma faixa espectral do analito em estudo.

1.4.2.2 Método indireto

Neste método, o nitrato é reduzido a nitrito, e quantificado posteriormente. Ele apresenta vantagens em relação ao direto, pois, possui maior sensibilidade, precisão, melhor seletividade e tem uma maior velocidade analítica [37].

O ***método da hidrazina***, relatado nos trabalhos de MULLIN e RILEY; KAMPHAKE et. al.; e GOLDEN, consiste em reduzir nitrato a nitrito em meio alcalino, utilizando Cu (II) como catalisador, e posterior análise de nitrito pelo método da diazotação da sulfanilamida. Porém, o percentual de redução varia de 50 a 69% [42], [43]. Apesar de não ser, do ponto de vista prático, analiticamente demorada e também ser de simples manuseio, existem alguns fatores que dificultam a sua utilização, como: o efeito catalítico da hidrazina funciona mediante proporcionalidade com a quantidade de íons nitrato, ou seja, a quantidade de hidrazina adicionada deve corresponder de modo proporcional a quantidade de nitrato presente na amostra, porém, se tratando de uma amostra cujas concentrações são desconhecidas não teria como adicionar quantidades de hidrazina de modo proporcional; um outro fator é que apesar da hidrazina conseguir reduzir os íons nitrato a nitrito, o meio com pH abaixo de 7,0 promove também redução dos íons nitrito a amônio [44], não podendo assim efetuar a determinação; entretanto, se o meio for básico, o nitrito não é reduzido, porém, os reagentes utilizados na extração (metodologia utilizada neste trabalho) promove a formação de hidróxidos insolúveis observado pela precipitação no meio, promovendo assim opacidade da solução e impossibilitando a análise do mesmo.

Todavia, um dos métodos mais utilizados são através da aplicação de cadmio como agente redutor [45]. Aplicação da coluna de cadmio (sulfato de cádmio) suportado em zinco metálico [33], [43], sistema adotado neste trabalho; colunas de limalhas de cádmio cobreado [41], [43]; cádmio amalgamado (50% Cd, 45% Al e 5% Zn) [7].

Capítulo 2 - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 OBJETIVO GERAL

- Promover a otimização de metodologia de quantificação de íon nitrito em matrizes cárneas.

2.1.1 Objetivos específicos

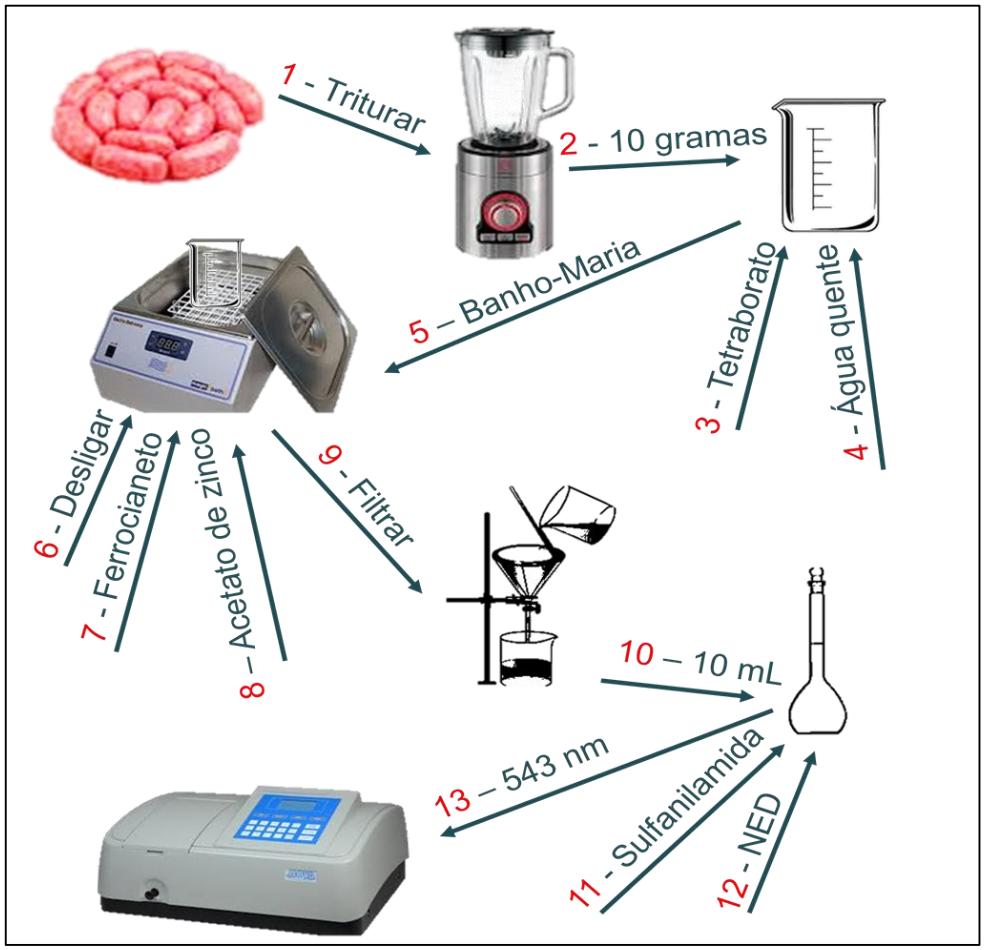
- Otimizar extração do íon nitrito da matriz cárnea;
- Otimizar metodologia de quantificação do íon nitrito pelo método de Griess, tanto pela análise espectrofotométrica comum, quanto pelo em prego do sistema FIA;
- Otimização da metodologia de redução de nitrato a nitrito utilizando coluna de cádmio e zinco

2.2 OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE ÍONS NITRITO

As amostras de linguiça (frango, mista e suína) foram adquiridos em supermercados da cidade de Jequié, Bahia, Brasil. O tratamento consistiu em separar as partes cárneas do resto (pele, gordura, etc.) da linguiça e tritura-las de forma a obter uma amostra com maior superfície de contato (que aumenta a eficiência de extração dos íons).

Aproximadamente, 10 gramas da amostra triturada foi tratada com solução tetraborato de sódio deca-hidratado 5% (m/v) (solvente extrator) e aquecimento em banho-maria a 80ºC com agitação. Em seguida foram adicionados ao meio 5 mL de solução de hexacianoferrato de potássio tri-hidratado 15% (m/v) e 5 mL de acetato de zinco di-hidratado 30% (m/v) que juntos forma um complexo coagulante, onde muitas pequenas partículas agregam-se sobre a superfície do complexo dando ideia de purificação do meio reacional; um processo semelhante a esse é utilizado no tratamento de água. Por fim, o composto foi passado por filtro de papel, finalizando assim a extração [33], como pode ser observado melhor no fluxograma da Figura 7 abaixo.

Figura 7 – Fluxograma da metodologia de extração dos íons nitrito da matriz cárnea em amostra de linguiças do tipo frescal. Os números de 1 a 13 indicam a ordem em que cada etapa é executada.



FONTE: Própria.

Neste processo de extração dois fatores foram levados em consideração para promover a otimização do sistema: o volume de solução de tetraborato de sódio e tempo de aquecimento em banho-maria. O planejamento experimental (composto central) foi elaborado e analisado através do programa Statisca10®, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Planejamento estatístico Composto Central para otimização da metodologia de extração de íons nitrito de amostras cárneas.

Experimento	Volume de solução de tetraborato de sódio (mL)	Tempo de aquecimento (min)
01	12,5 (1)	82,5 (1)
02	7,5 (-1)	82,5 (1)
03	12,5 (1)	37,5 (-1)
04	7,5 (-1)	37,5 (-1)
05	10 (0)	60 (0)
06	10 (0)	60 (0)
07	10 (0)	60 (0)
08	10 (0)	27,6 ($-\sqrt{2}$)
09	10 (0)	92,4 ($\sqrt{2}$)
10	13,6 ($\sqrt{2}$)	60 (0)
11	6,4 ($-\sqrt{2}$)	60 (0)

Após a otimização do método de extração, foi feito uma avaliação da exatidão deste método. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão [46].

Neste caso, a adição padrão foi utilizada para verificar a exatidão do método. Dessa forma, quantidades conhecidas de nitrito (20; 40; 160; 640 e 1120 µg) foram adicionadas nas amostras de linguiça.

2.3 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE REDUÇÃO DE NITRATO A NITRITO

Algumas metodologias para determinação de nitrato foram testadas, como: o método direto na região do ultravioleta; o método do salicilato; o método da hidrazina; e a coluna de cádmio e zinco. Porém, o utilizado neste trabalho foi a metodologia de redução de nitrato a nitrito via coluna redutora de cádmio e zinco, visto a praticidade e eficiência deste procedimento em relação aos demais citados. A ideia básica desta metodologia foi otimizar uma coluna de cádmio que fosse capaz de reduzir íons nitrato a nitrito, baseado na metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz, 2008.

No preparo da coluna, aproximadamente, 25 gramas de zinco em pó foram imersos em 500 mL de solução de sulfato de cádmio 20% (m/v). Esperou-se por cerca de 30 minutos para promover a deposição total do cádmio e na superfície do zinco. Depois a parte sólida foi retirada, triturada e passada em uma peneira de 40 mesh. O sólido obtido foi tratado com

solução ácido clorídrico 2 mol/L por 2 minutos, e, posteriormente, o mesmo foi deixado por 15 minutos em uma solução 10% (v/v) tampão amoniacal pH 10.

Com o sólido obtido, fez-se a otimização, preenchendo colunas de 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5 e 9,0 cm de altura com 1 cm de diâmetro. A eficiência ou percentual de redução da coluna foi testada pela aplicação dos padrões de concentrações 0,732; 1,464; 4,394; 7,322 e 10,252 µg/mL de nitrato de potássio. E a exatidão do método foi avaliada pelo teste de adição padrão, com quantidades conhecidas de nitrato (36,61; 73,22; 219,68; 366,12 e 512,58 µg).

2.4 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA CONVENCIONAL DE QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS NITRITO

A determinação dos íons nitrito nas amostras foi feita pelo método colorimétrico proposto por Griess em 1879, chamado de *diazotação da sulfanilamida*, que envolve a reação dos íons nitrito presentes nas amostras com a sulfanilamida, e posteriormente, com N-(1-naftil)etilenodiamino bicloridrato (NED). Essas reações promovem uma mudança de coloração no meio reacional, passando de incolor para róseo, assim, o produto resultante da reação é lido no comprimento de onda de 543 nm em espectrofotômetro.

No processo de otimização desse sistema, dois fatores foram levados em consideração: volume de solução de sulfanilamida e o volume de reagente NED. O planejamento experimental (composto central) foi elaborado através do programa Statisca10®, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Planejamento estatístico Composto Central para otimização da metodologia de quantificação do íon nitrito.

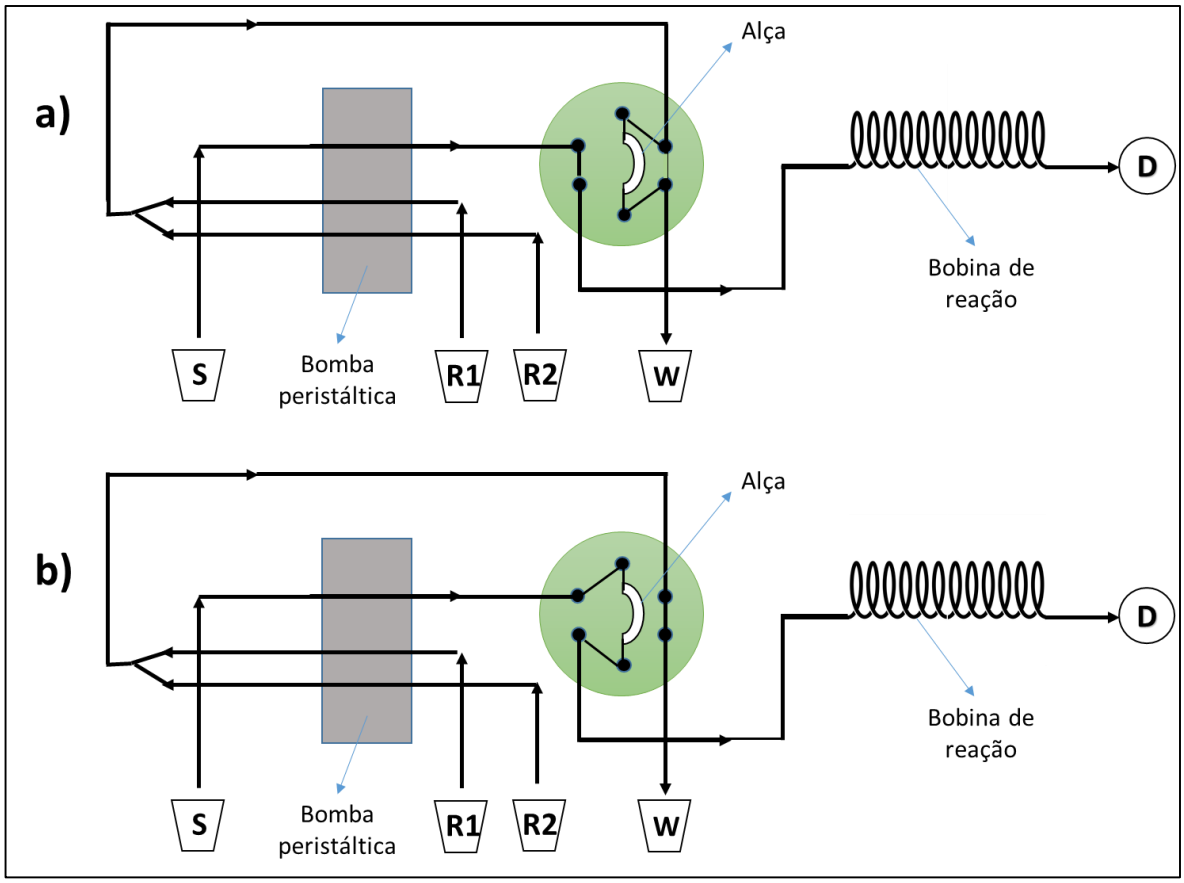
Experimento	Volume de Sulfanilamida (mL)	Volume de NED (mL)
01	3 (-1)	3 (-1)
02	3 (-1)	5 (1)
03	8 (1)	3 (-1)
04	8 (1)	5 (1)
05	5,5 (0)	4 (0)
06	5,5 (0)	4 (0)
07	5,5 (0)	4 (0)
08	1,75 ($-\sqrt{2}$)	4 (0)
09	9,25 ($\sqrt{2}$)	4 (0)
10	5,5 (0)	2,5 ($-\sqrt{2}$)
11	5,5 (0)	5,5 ($\sqrt{2}$)

Após o processo de otimização fez-se uma varredura na faixa 800 a 400 nm com os padrões de nitrito (0,04; 0,16; 0,32; 0,48; 0,64; 0,80; 0,96 e 1,12 µg/mL) para obter o comprimento de onda de maior sinal. E posteriormente, a curva foi feita em triplicata, com os mesmos padrões citados anteriormente, em comprimento de onda de 543 nm.

2.5 OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS NITRITO VIA FIA

O sistema de análise de injeção em fluxo utilizado, consiste de uma bomba peristáltica com controle de rotação; tubos de teflon; tubos de silicone; válvula rotatória de 6 vias; conectores; cubeta; detector (espectrofotômetro). O esquema de apresentação do sistema está expresso na Figura 8 a seguir.

Figura 8 – Esquema do sistema de análise de injeção em fluxo utilizado neste trabalho. a) Pré-injeção dos reagentes (R1 – NED) e (R2 – sulfanilamida) na alça. b) amostra (S) sendo utilizada como solução carreadora, responsável por carregar os reagentes à bobina de reação, e posteriormente ao detector (D), sendo os resíduos liberados no descarte (W).



FONTE: Própria.

Na otimização desse sistema os aspectos levados em consideração foram: tamanho da alça; vazões de amostras e reagentes; e concentração dos reagentes. No processo de otimização tamanho da alça, foram avaliados os comprimentos de 10; 15; 20; 25; 30; 40; e 45 cm de tubo de teflon com diâmetro de 0,1 cm. Já na otimização da velocidade de rotação foi ajustada mediante controle acoplado à bomba peristáltica, utilizando vazões de amostras de 2,0; 4,7; 7,1; 10,2; 13,2; 16,4; 19,2; 21,2; 24,6 e 28,8 mL/min; as vazões de sulfanilamida de 3,6; 7,6; 12,0; 17,6; 21,6; 26,4; 31,2; 36,0; 40,5 e 44,4 mL/min e vazões de NED de 2,2; 5,0; 8,0; 11,2; 15,6; 20,6; 23,2; 26,6; 29,6 e 32,4 mL/min. Como toda a metodologia se trata de reações que envolvem o desenvolvimento de cor através de reações químicas, e neste caso específico, os reagentes são NED e Sulfanilamida; um modo de otimização seria considerar os volumes e as concentrações de cada reagente.

O passo inicial da otimização foi feito em termos de proporção entre as concentrações dos reagentes. E as proporções (NED:Sulfanilamida) avaliadas foram: 1:9; 1:8; 1:7; 1:6; 1:5; 1:4; 1:3; 1:2; 1:1; e 2:1.

Após obter a melhor proporção entre os reagentes, foi avaliado, as melhores concentrações de trabalho, avaliando 7 combinações de diferentes concentrações (0,0033 e 0,0100; 0,0167 e 0,0500; 0,0333 e 0,1000; 0,0667 e 0,2000; 0,1002 e 0,3000; 0,1334 e 0,4000; 0,1667 e 0,5000 µg/mL) de NED e Sulfanilamida, mantendo a proporção otimizada.

Uma vez que foi encontrado as melhores condições de trabalho, tornou-se possível a construção da curva de calibração com as seguintes concentrações de nitrito: 0,010; 0,020; 0,030; 0,040; 0,060; 0,070; e 0,080 µg/mL.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO

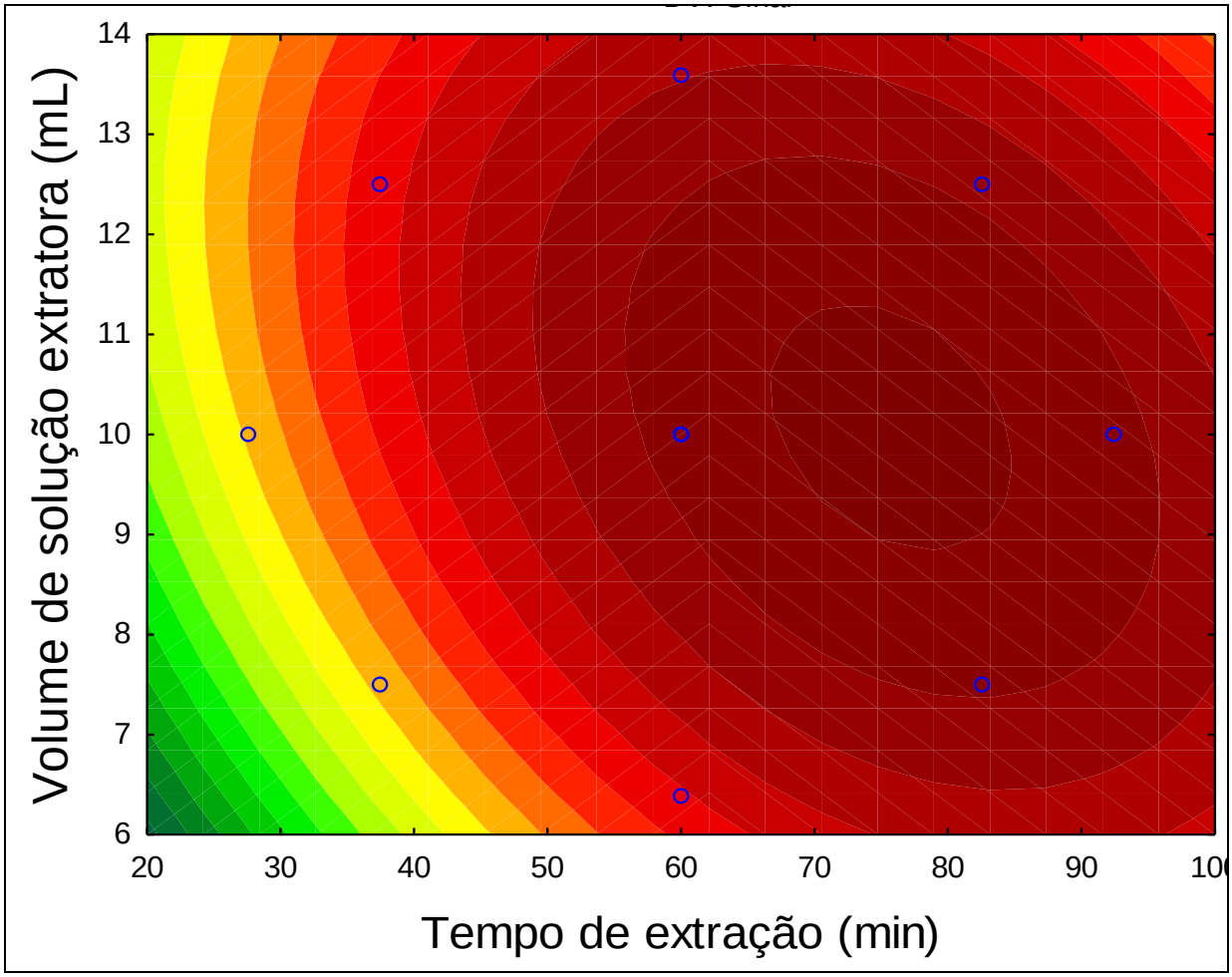
A estrutura do experimento, Tabela 3, chamada de planejamento composto central, foi definida pelo Experimental Design (DOE) contido no programa Statistica10®. A intenção deste tipo de planejamento manifesta-se na suposição de avaliar uma interação mais intensa entre os fatores [47], [48] em questão (tempo de extração e volume de solvente extrator), que gera resultados mais precisos e satisfatórios no sentido de otimização do sistema.

Tabela 3 – Matriz planejamento composto central para duas variáveis na otimização da metodologia de extração do íon nitrito.

Experimentos	Tempo de extração (min)	Volume de solução extratora (mL)	Absorvância
1	82,5 (1)	12,5 (1)	0,0356
2	82,5 (1)	7,5 (-1)	0,0366
3	37,5 (-1)	12,5 (1)	0,0319
4	37,5 (-1)	7,5 (-1)	0,0293
5	60 (0)	10 (0)	0,0352
6	60 (0)	10 (0)	0,0346
7	60 (0)	10 (0)	0,0394
8	27,6 ($-\sqrt{2}$)	10 (0)	0,0296
9	92,4 ($\sqrt{2}$)	10 (0)	0,0360
10	60 (0)	13,6 ($\sqrt{2}$)	0,0354
11	60 (0)	6,4 ($-\sqrt{2}$)	0,0325

Os dados obtidos na execução dos experimentos que compõe a matriz acima geraram a superfície de resposta e curva de nível, conforme a Figura 9. O ponto ótimo, ou seja, o ponto que gera um maior sinal de resposta entre a interação de volume de extrator e tempo de extração, está entre os volumes de 9 a 11 mL e tempo de 65 a 85 min, ou na área vermelha mais intensa da curva de nível.

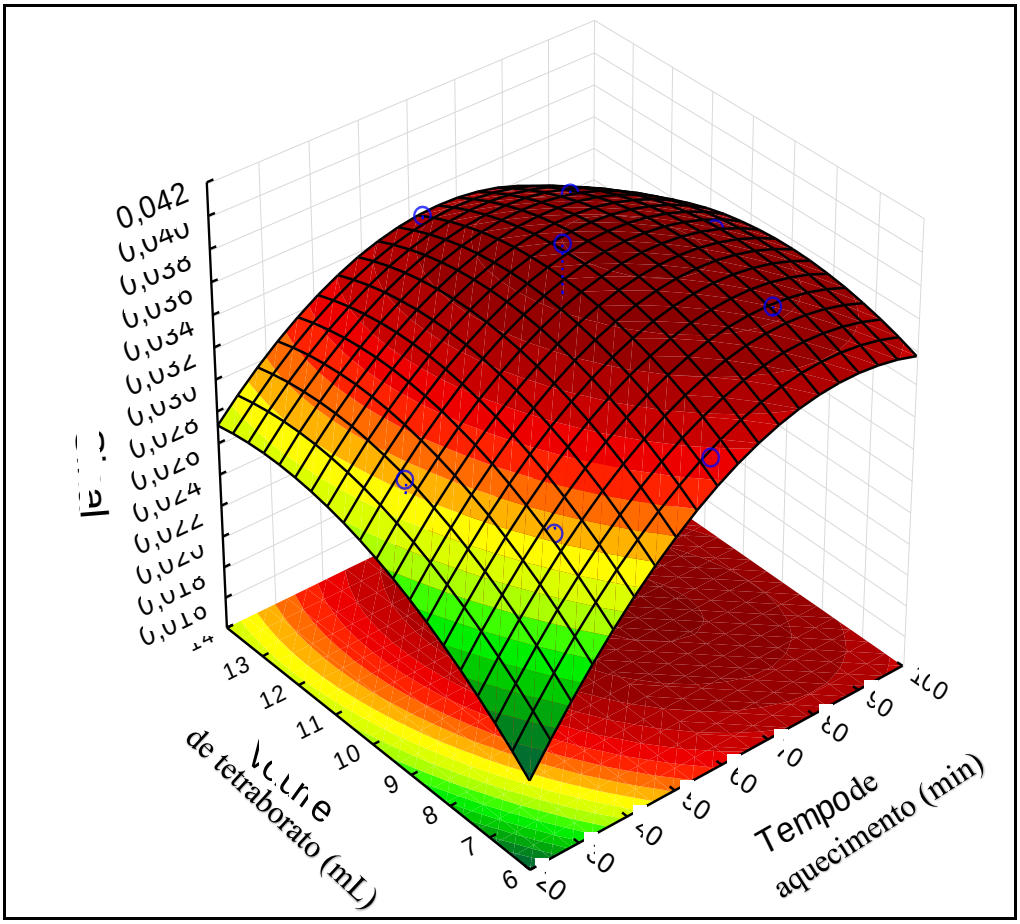
Figura 9 – Curva de nível gerada pelo processo de otimização da metodologia de extração de íons nitrito da matriz cárnea, utilizando como tetraborato de sódio como solução extratora.



Percebe-se uma superfície tridimensional gerada pela relação volume/tempo/sinal, representada na Figura 10, onde o Sinal (z) está em função de tempo e volume (x e y), gerando assim a Equação 4 que dar base para estabelecer que o ponto ótimo, ou seja, o ponto (x,y) que gera um maior sinal analítico (z) é **76 minutos e 10 mililitros**.

Equação 4: $Z(x, y) = -0{,}01 + 0{,}0007x - 0{,}000004x^2 + 0{,}005y - 0{,}0002y^2 - 0{,}00002xy$

Figura 10 - Superfície de resposta 3D gerada pelo processo de otimização da metodologia de extração de nitrito de matriz cárnea, utilizando tetraborato de sódio como solvente extrator.



O tempo de extração referido aqui está combinado com uma temperatura fixa de 80ºC. Em estudos prévios, foi demonstrado que o aquecimento favorece uma melhor extração. Porém, como se trata de um sistema aquoso, a temperatura precisa ser controlada para não promover a secura do material que resultaria, provavelmente, em conversão de algumas substâncias ou perdas por evaporação; e também o modo de aquecimento (banho maria), não permite temperaturas muito elevadas ou acima de 100ºC, uma vez que seria necessário a reposição periódica de água, o que promoveria mais desgastes e também oscilação da temperatura. Por isso considerou uma temperatura fixa de 80ºC como temperatura máxima para o sistema, deixando como fator determinante, o tempo de aquecimento.

Algumas informações sobre a eficiência do sistema de extração com os valores já otimizados, podem ser observados conforme a Tabela 4 abaixo. Para um sistema ser considerado eficiente ou válido, o fator de recuperação precisa estar na faixa de 70 a 120% com precisão de ±20% [46]. Todos os experimentos estão dentro da faixa aceitável de recuperação

com média de 89,2 ± 3,8%, exceto o experimento 1. A possível causa para o experimento 1 estar fora do valor aceitável é a pequena quantidade amostra em relação a quantidade de nitrito adicionado.

Tabela 4 – Teste de adição e recuperação aplicado ao sistema otimizado de extração de íons nitrito de matriz cárnea.

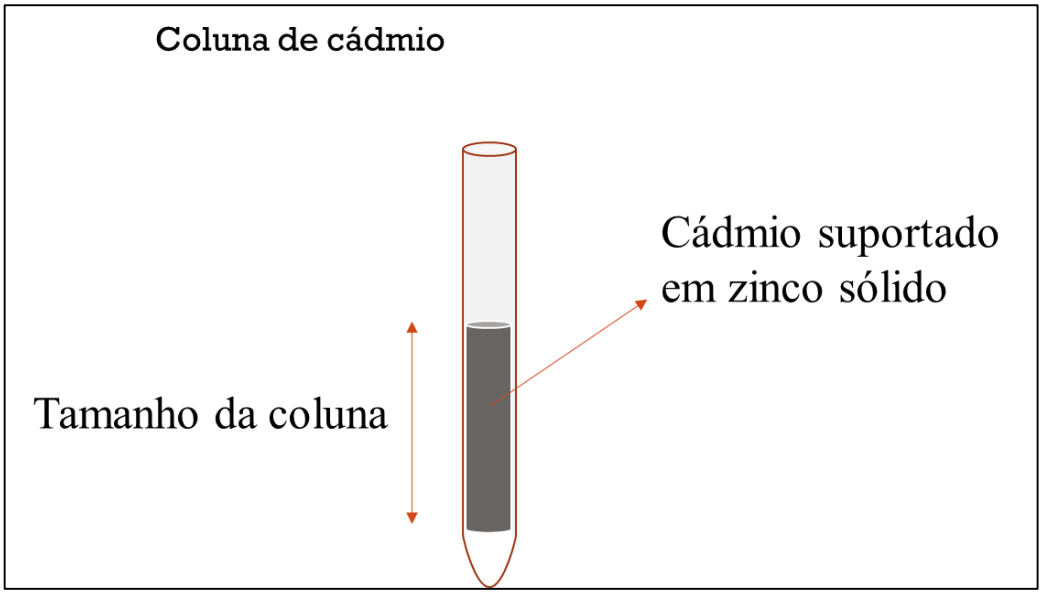
Experimentos	Nitrito adicionado (µg)	Nitrito recuperado (µg)	Fator de recuperação (%)	± IC (%)
1	20,00	11,76	63,3	13,2
2	40,00	35,88	89,7	10,3
3	160,03	139,28	87,0*	-
4	640,13	601,66	94,0	3,4
5	1120,23	966,19	86,2	1,7

Nota: n=3 e *n=2 com intervalo de 95 % de confiança.
I.C. - intervalo de confiança.

3.2 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE REDUÇÃO DE NITRATO A NITRITO

O método de redução de nitrato a nitrito via coluna de cádmio, proporcionou a análise indireta (quantificação de nitrito) de íons nitratos presentes nas amostras. Esta é uma metodologia simples e eficiente. O cádmio funciona como agente redutor suportado em zinco (que funciona como catalisador e auxiliador no processo de redução). O esquema da coluna de redução pode ser observado na Figura 11 a seguir.

Figura 11 – Esquematização da coluna de redução de cádmio suportado em zinco metálico.



FONTE: Própria.

Na otimização desse sistema, o fator levado em consideração foi o tamanho da coluna mantendo a mesma massa de amostra em todos os experimentos. Como pode ser percebido, a Tabela 5 traz resultados do processo de otimização da coluna de cádmio, onde são os desvios padrões relativos (RSDs) que variaram de 0,2 a 1,9%, o que significa dizer que este sistema de redução tem alto nível de precisão.

Tabela 5 – Resultados do processo de otimização do tamanho da coluna redutora.

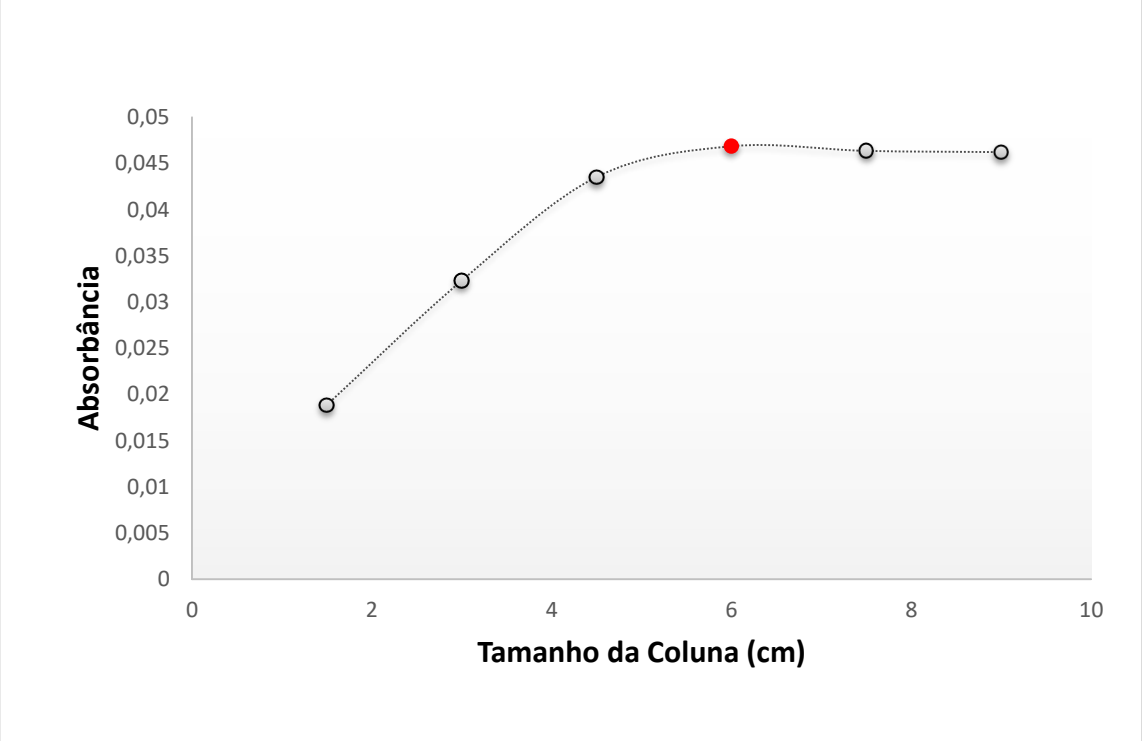
Experimento	Tamanho da Coluna (cm)	Absorvância	RSD (%)
1	1,5	0,0188	1,1
2	3,0	0,0323	0,6
3	4,5	0,0435	0,7
4	6,0	0,0469	1,9
5	7,5	0,0464	0,2
6	9,0	0,0462	0,9

Nota: n = 3 e intervalo de 95% de confiança.
RSD – desvio padrão relativo

Com os resultados expressos na Tabela 5 foi possível plotar os gráficos abaixo. Analisando a Figura 12, que relaciona tamanho da coluna e absorbância, pode-se perceber que

há uma linearidade até 4,5 cm; aos 6 cm a absorbância é máxima e a partir daí ela passa a expressar um leve declínio conforme o aumento no comprimento da coluna.

Figura 12 - Otimização do tamanho da coluna de redução.



Considerou-se que o tamanho ótimo da coluna foi 6,0 cm. Sendo assim, como a vazão está associada ao tamanho da coluna, a vazão considerada para o trabalho foi 7,7 mL/min.

Já no teste de eficiência de redução de nitrato a nitrito, utilizando a coluna de cádmio e zinco, conforme Tabela 6, o percentual de redução variou entre 74,5 a 82,1% com média de 78,5 e erro associado de 2%. Isto indica que a metodologia é eficiente no processo de redução do íon nitrato a nitrito.

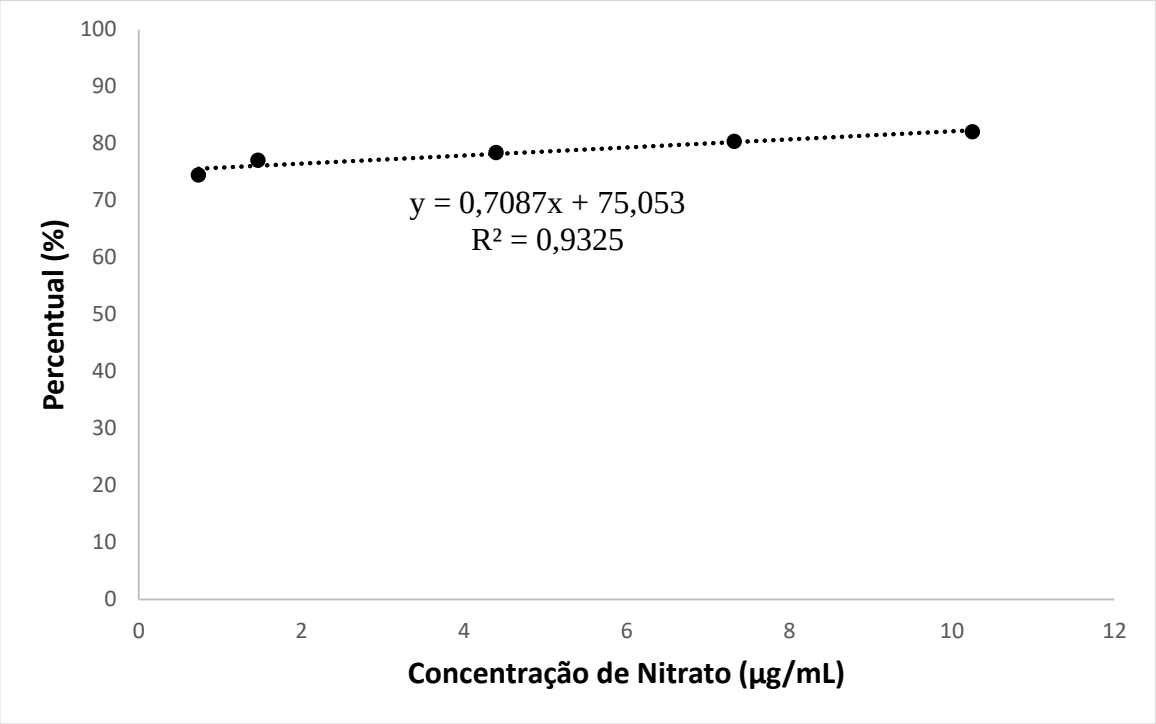
Tabela 6 - Resultados do teste de eficiência da coluna redutora de cádmio e zinco.

Experimentos	Nitrato adicionado (µg)	Nitrato reduzido (µg)	Concentração (µg/mL)	Percentual de redução (%)	RSD (%)
1	36,61	27,27	0,732	74,5	0,7
2	73,22	56,45	1,464	77,1	0,7
3	219,68	172,20	4,394	78,4	1,0
4	366,12	294,22	7,322	80,4	0,5
5	512,58	420,70	10,252	82,1	1,3

Nota: n =3 e intervalo de 95 % de confiança.

Analisando os RSDs, pode-se concluir que há uma grande precisão entre os resultados, estabelecendo, assim, confiabilidade no trabalho. E que há uma relação de linearidade entre o percentual de redução e a concentração de nitrato, conforme Figura 13. Sendo que a tendência ideal seria um valor igual de percentual de redução para cada concentração de nitrato. De acordo com o gráfico abaixo, há uma certa variação no percentual de redução, porém, não é significativo, uma vez que que o desvio padrão relativo de todos os valores de percentuais encontrados é **3,4%,** sendo o valor aceitável ≤ 5,0%.

Figura 13 - Relação entre a concentração de nitrato e o percentual de redução.



Em relação ao teste de exatidão, conforme a Tabela 7, a média do fator de recuperação foi de 80,3 ± 1,8%, que está dentro da faixa aceitável de 70 a 120% [46], sendo assim, o sistema de redução aplicável para a matriz amostral.

Tabela 7 - Resultados encontrados no ensaio de adição e recuperação do sistema de redução otimizado.

Experimentos	Nitrato adicionado (µg)	Nitrato recuperado (µg)	Fator de recuperação (%)	IC (%)
1	36,61	37,51	102,5	1,3
2	109,88	75,86	69,1	0,6
3	183,06	132,86	72,6	3,2
4	256,29	197,46	77,0	2,0

Nota: n = 3 e intervalo de 95% de confiança.

Um dos principais problemas relacionados a redução via coluna de cádmio seria a falta de estabilidade durante a análise. Então para testar a estabilidade da coluna foram feitos experimentos sucessivos com 8 repetições em triplicata, totalizando 24 experimentos sem a necessidade de ativação da coluna, como pode ser observado na Tabela 8 abaixo, e melhor entendido a partir dos resultados descritos na Figura 14.

A ativação da coluna é realizada como procedimento padrão para proporcionar resultados mais precisos, uma vez que, conforme a realização dos experimentos a coluna perde as propriedades redutores devido a oxidação do sistema. Todavia, para garantir a eficiência da coluna é feita ativação utilizando 25 mL de solução de HCl 0,1 mol/L e 25 mL de solução tampão amoniacal a pH 10.

Ou seja, os resultados indicam que a coluna de redução é eficiente em até 24 experimentos sem a necessidade de ativação. Todavia, embora tendo esta eficiência, a cada experimento em triplicata, a coluna foi ativada.

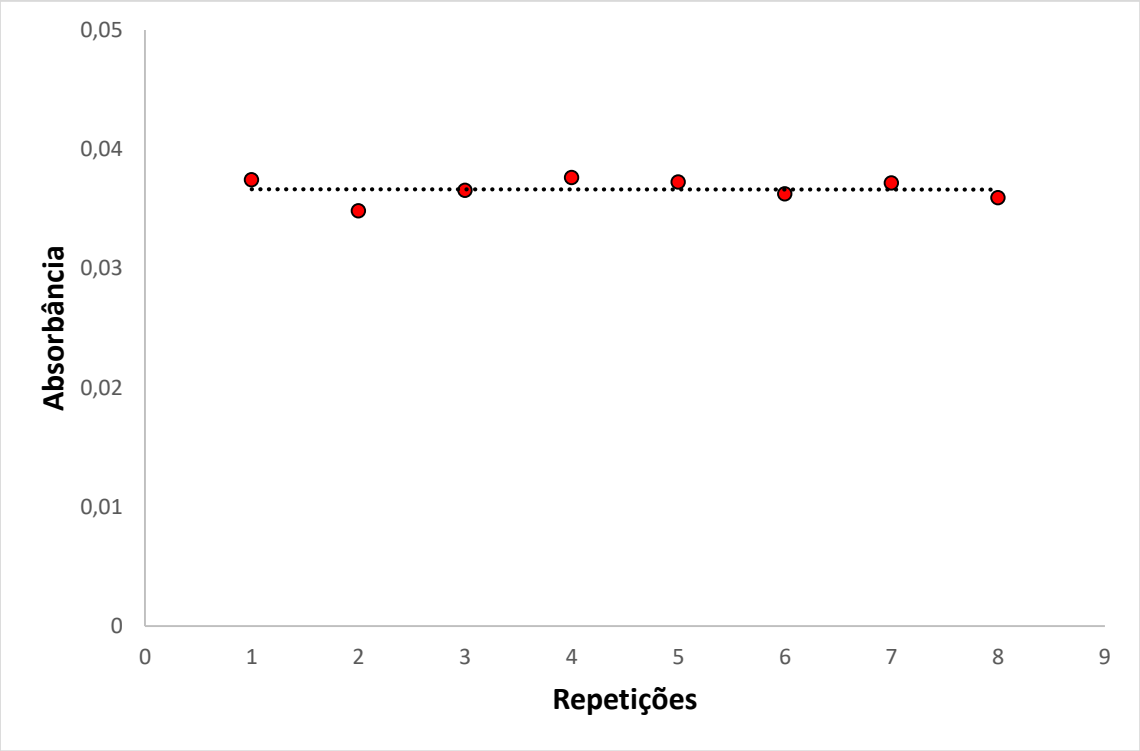
Tabela 8 - Comportamento da coluna mediante 8 repetições sucessivas ou 24 experimentos sem ativação da coluna redutora.

Repetições	Absorvância	DRP (%)
1	0,0374	0,6
2	0,0348	0,9
3	0,0366	1,1
4	0,0376	0,8
5	0,0373	1,5
6	0,0363	0,4
7	0,0372	3,9
8	0,0359	0,6

Nota: n = 3 e intervalo de 95 % de confiança.

Comparando a primeira repetição com a última, tem-se que há uma diferença de apenas 4,5%, o que não é uma diferença significativa, sendo que a significância é assumida acima de 5 % [49]. E que há uma constância entre os resultados uma vez que a desvio padrão relativos para as 8 repetições de aproximadamente 2,6%, sendo considerado como aceito, valores ≤ 5,0%.

Figura 14 - Comportamento da coluna mediante repetições sucessivas sem ativação da mesma entre cada experimento.



3.3 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DO ÍON NITRITO

Na análise no espectro visível (com promoção de cor no meio reacional), a especificidade é maior, uma vez que, na maioria das vezes, dependendo do tipo de reação, os reagentes interagem com o analito de forma singular. Gerando ao meio reacional uma coloração própria para o tipo de interação, garantindo assim a especificidade do sistema.

A quantificação do íon nitrito está baseada na promoção da reação da sulfanilamida com o íon nitrito, formando um composto intermediário. Esse composto então reage posteriormente com NED, formando assim um complexo colorido (coloração rósea), chamado de azocomposto. Sendo possível sua análise via técnica espectrofotométrica na região do espectro visível.

A otimização funciona como avaliação de combinação entre as variáveis ou fatores na tentativa de encontrar uma combinação que melhor represente o sistema [48]. Neste caso específico, quatro fatores são influenciadores: concentração de NED; volume de NED; concentração de sulfanilamida; e volume de sulfanilamida. Porém, tanto a concentração quanto o volume trabalham em cima de uma única grandeza que é a quantidade de matéria. Sendo assim, considerou os volumes como fatores influenciadores, utilizando um único valor de concentração para cada reagente. As concentrações fixadas (NED 0,1% (m/v) e Sulfanilamida 0,5% (m/v)) foram baseadas no trabalho proposto por IAL (2008).

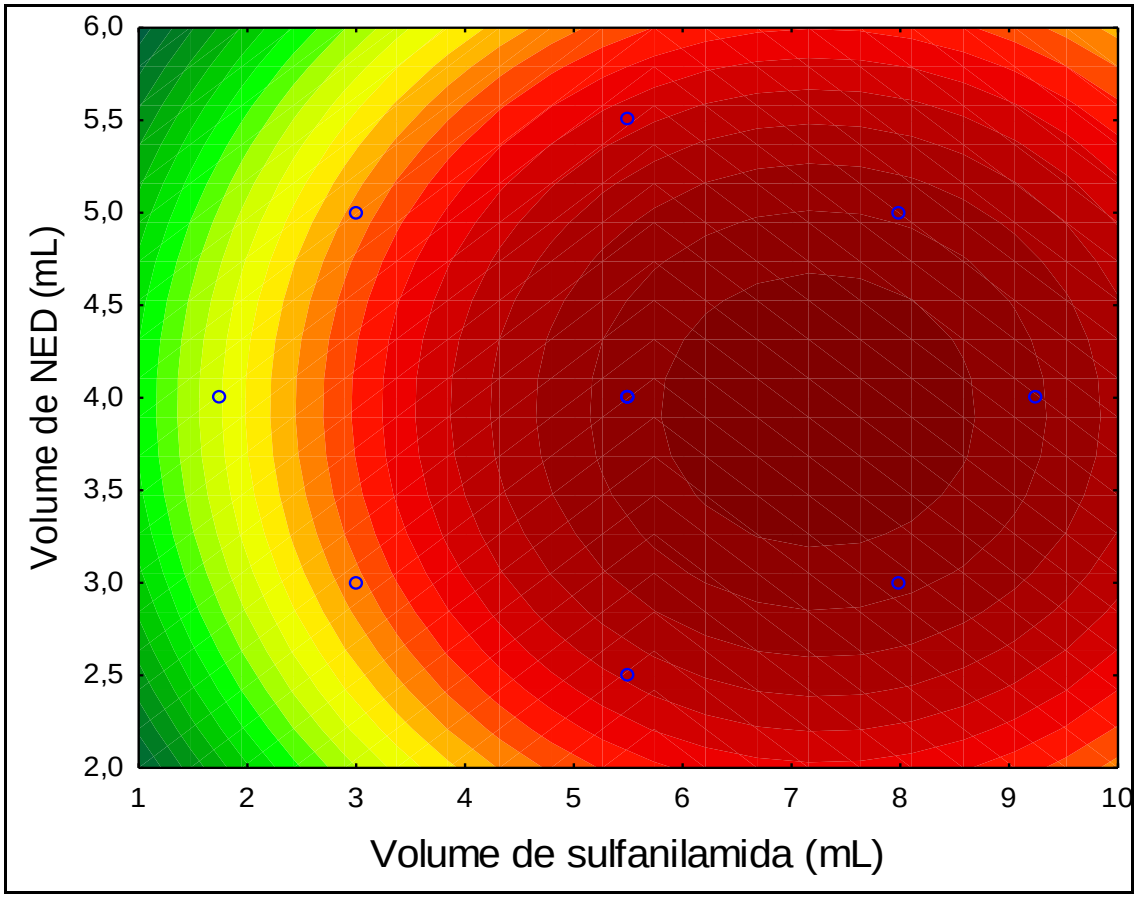
Os resultados gerados pela interação da sulfanilamida e NED, de acordo com a Tabela 9, chamada de calibração multivariada [47], [50], conforme as proporções descritas em cada experimento.

Tabela 9 - Matriz planejamento composto central para duas variáveis no processo de otimização do sistema de quantificação do íon nitrito.

Experimentos	Volume de sulfanilamida (mL)	Volume de NED (mL)	Absorvância
01	3 (-1)	3 (-1)	0,0059
02	3 (-1)	5 (1)	0,0040
03	8 (1)	3 (-1)	0,0334
04	8 (1)	5 (1)	0,0311
05	5,5 (0)	4 (0)	0,0288
06	5,5 (0)	4 (0)	0,0292
07	5,5 (0)	4 (0)	0,0288
08	1,75 $(-\sqrt{2})$	4 (0)	0,0052
09	9,25 $(\sqrt{2})$	4 (0)	0,0219
10	5,5 (0)	2,5 $(-\sqrt{2})$	0,0194
11	5,5 (0)	5,5 $(\sqrt{2})$	0,0196

Os dados obtidos na execução dos experimentos que compõe a matriz acima geraram a superfície de resposta e curva de nível abaixo na Figura 15, através do programa Statistica10®.

Figura 15 – Curva de nível gerada pelo processo de otimização do sistema de quantificação íon nitrito.



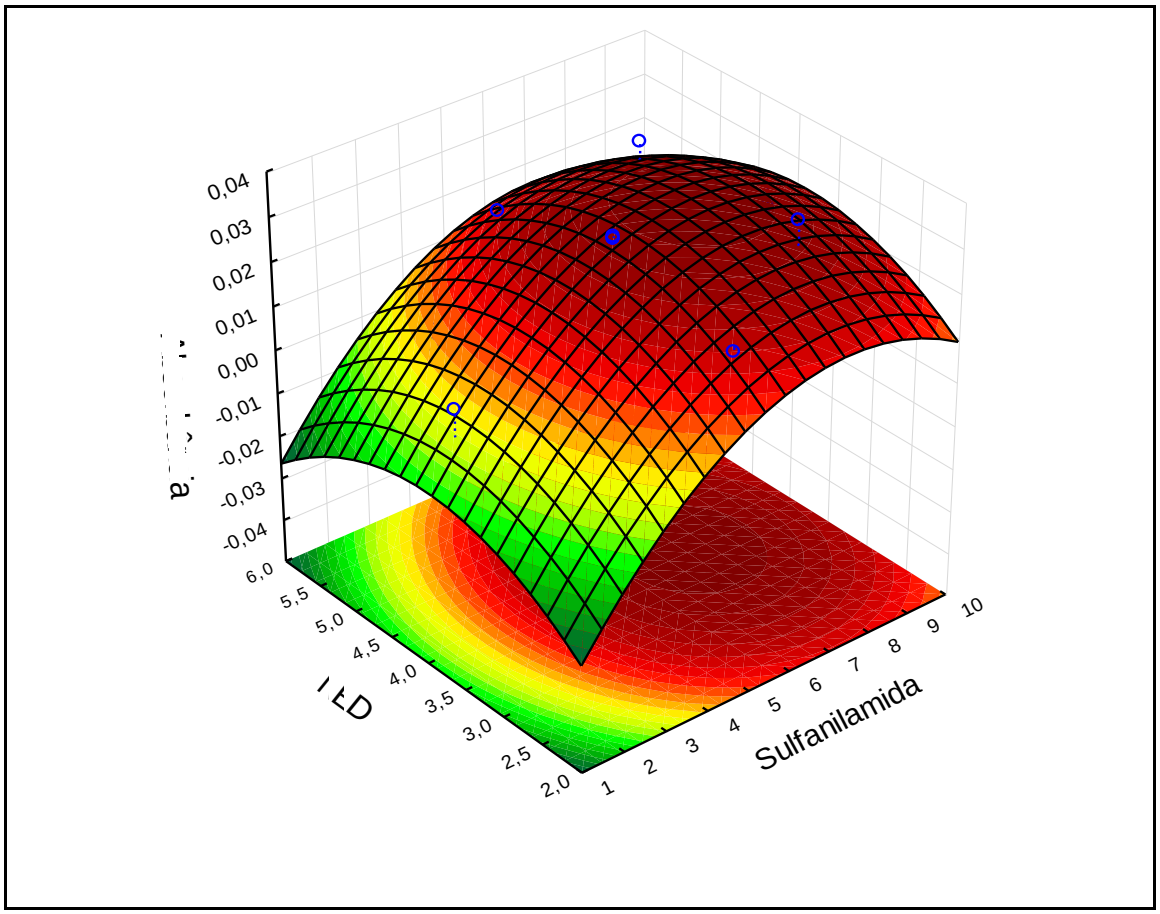
Nesta curva, Figura 15, pode-se perceber que há uma região com coloração vermelha intensa, esta região indica a faixa onde as interações de NED e Sulfanilamida apresentaram melhores respostas analíticas.

A faixa varia de 6 a 8,5 mL de sulfanilamida e 3 a 4,5 mL de NED. Já a Figura 17, traz consigo uma superfície tridimensional (superfície de resposta) gerada pela interação NED e Sulfanilamida e a resposta dessa interação (Absorvância). Esta superfície gerou uma Equação z que está em função de x e y, para x (Sulfanilamida) e y (NED), descrita abaixo.

A Equação 5 possibilita estabelecer que o ponto ótimo (representada pela Figura 16), ou seja, o ponto (x,y) que gera um maior sinal analítico (z). Sendo assim, o ponto ótimo encontrado foi 7,0 e 4,0 ml de sulfanilamida e NED, respectivamente.

Equação 5: $Z(x, y) = - 0,09 + 0,02x - 0,001x^2 + 0,03y - 0,004y^2 - 0,00005xy$

Figura 16 - Superfície de resposta 3D gerada pelo processo de otimização do sistema de quantificação do íon nitrito.



Após a otimização desse sistema foi realizado a construção de uma curva analítica. Os dados estão descritos na Tabela 10. Os resultados compreendem um desvio padrão de relativo que varia de 0,4 a 2,9%, indicando assim precisão entre os mesmos. Antes do desenvolvimento analítico da curva, obteve-se o melhor comprimento de onda a ser utilizado, através de varredura entre 400 e 800 nm, Figura 17.

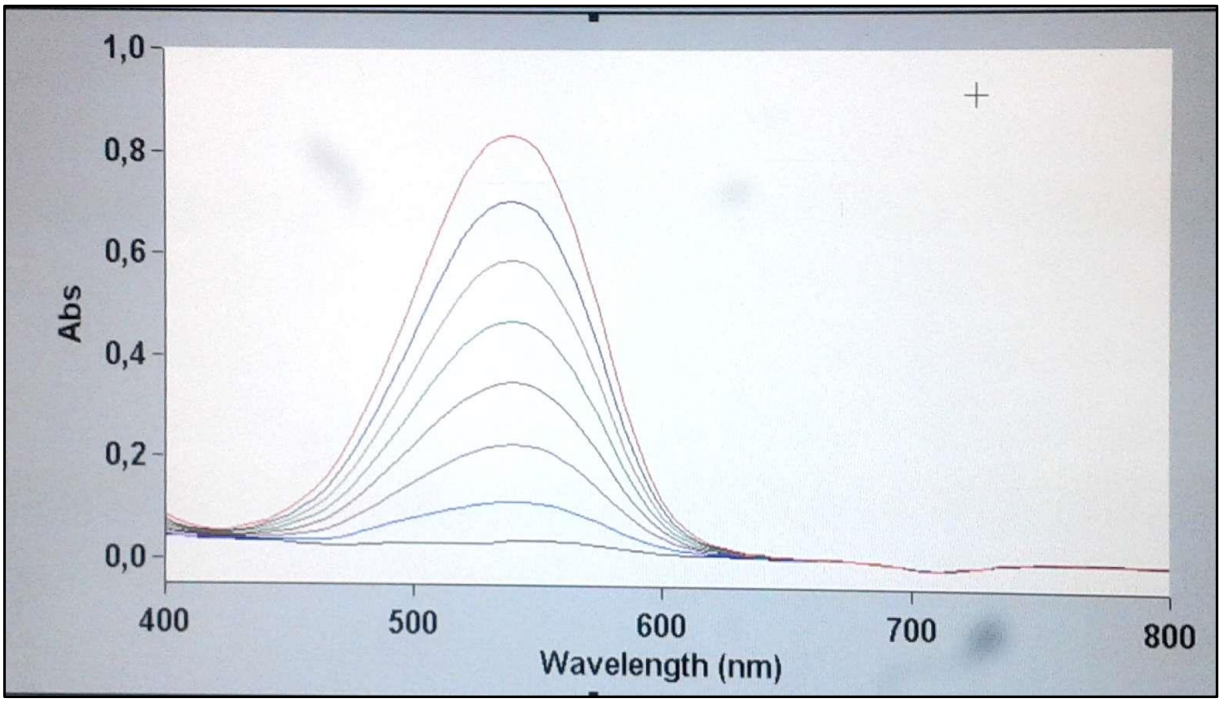
Tabela 10 – Dados obtidos para a construção da curva de calibração e avaliação do efeito matriz, utilizando amostras de linguiça de carne, frango e mista.

Experimentos	Concentração (µg/mL)	Absorbância da matriz*	Absorbância do padrão	DPR (%)
01	0,04	0,1719	0,0239	2,9
02	0,16	0,2597	0,0990	0,9
03	0,32	0,3766	0,2126	0,4
04	0,48	0,5066	0,3329	0,7
05	0,64	0,6318	0,4523	0,4
06	0,80	0,7414	0,5740	1,1
07	0,96	0,8610	0,6945	1,5
08	1,12	0,9850	0,8160	1,2

Nota: n = 3 e intervalo de 95 % de confiança. *Avaliação do efeito matriz.

A varredura, figura 18, foi feita de 400 a 800 nm com concentrações que variaram de 0,04; 0,16; 0,32; 0,48; 0,64; 0,80; 0,96 e 1,12 µg/mL. E de acordo com ela a absorbância máxima se deu, para todas as concentrações, no intervalo de 540 a 545 nm, porém, o comprimento de onda escolhido foi de 543 nm.

Figura 17 – Picos de máxima absorção com varredura de 400 a 800 nm para concentrações de nitrito variando de 0,04 a 1,12 µg/mL.

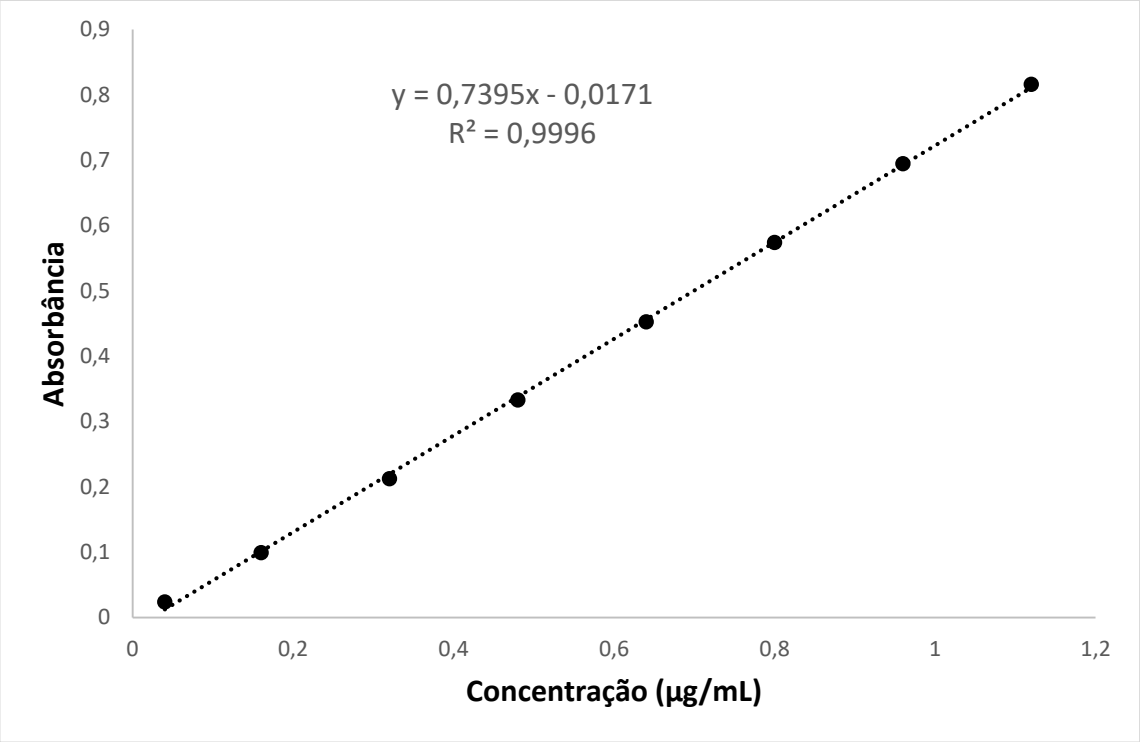


Fonte: Próprio autor.
Nota: Gráfico gerado pelo programa Cary 50.

Após a escolha do comprimento de onda ideal, foi feito a curva de calibração expressa na Figura 18.

A curva abaixo expressa linearidade na faixa de concentração de 0,04 a 1,12 µg/mL, e isso pode ser melhor evidenciado pelo fator R^2 que foi igual a 0,9996, sendo que a ANVISA recomenda um coeficiente de correlação de 0,99 [51], e ainda que um coeficiente maior de 0,999 pode ser considerado como evidência de um ajuste ideal [46].

Figura 18 - Curva de calibração para concentração de nitrito variando de 0,04 a 1,12 µg/mL.



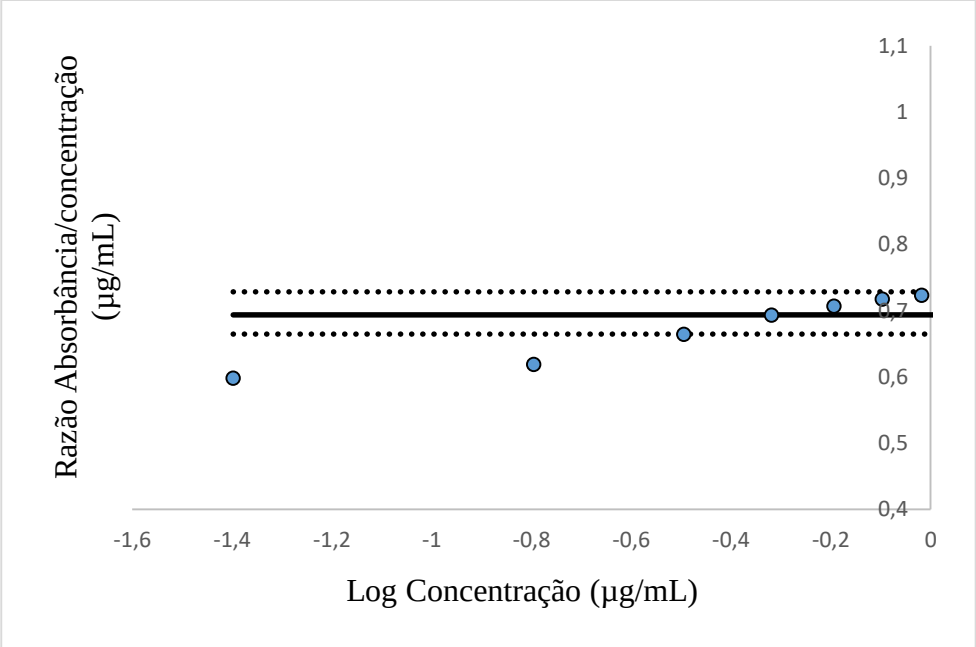
Ainda referente a curva de calibração acima, pode-se encontrar o Limite de Detecção (Equação 6) e Limite de Quantificação (Equação 7) do método [46], conforme equações abaixo.

Equação 6: $\boldsymbol{LD = 3,3 \times \frac{s}{S}}$ e Equação 7: $\boldsymbol{LQ = 10 \times \frac{s}{S}}$

Onde, “s” é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da Equação; “S” é o coeficiente angular da curva de calibração. Sendo assim, o LD e LQ foram, respectivamente, 0,01 e 0,03 µg/mL ou 1,1 e 3,3 mg/kg.

Outra questão a ser observada é a diferença entre a faixa de concentração e faixa linear dinâmica. E analisando o R^2 tem-se que essa faixa de concentração apresenta linearidade, porém, não significa dizer que todos os pontos estão realmente dentro de uma faixa linear dinâmica [46]. Para encontrar a faixa linear dinâmica, proposta por August et al, foi construída uma curva relacionando as respostas relativa (absorbância/concentração) e o logarítmico da concentração. Nesta curva foram plotadas outras linhas horizontais paralelas para 95 e 105 % da linha da faixa linear [46], de acordo com a Figura 19. A faixa linear dinâmica encontrada foi de 0,32 a 1,12 µg/mL.

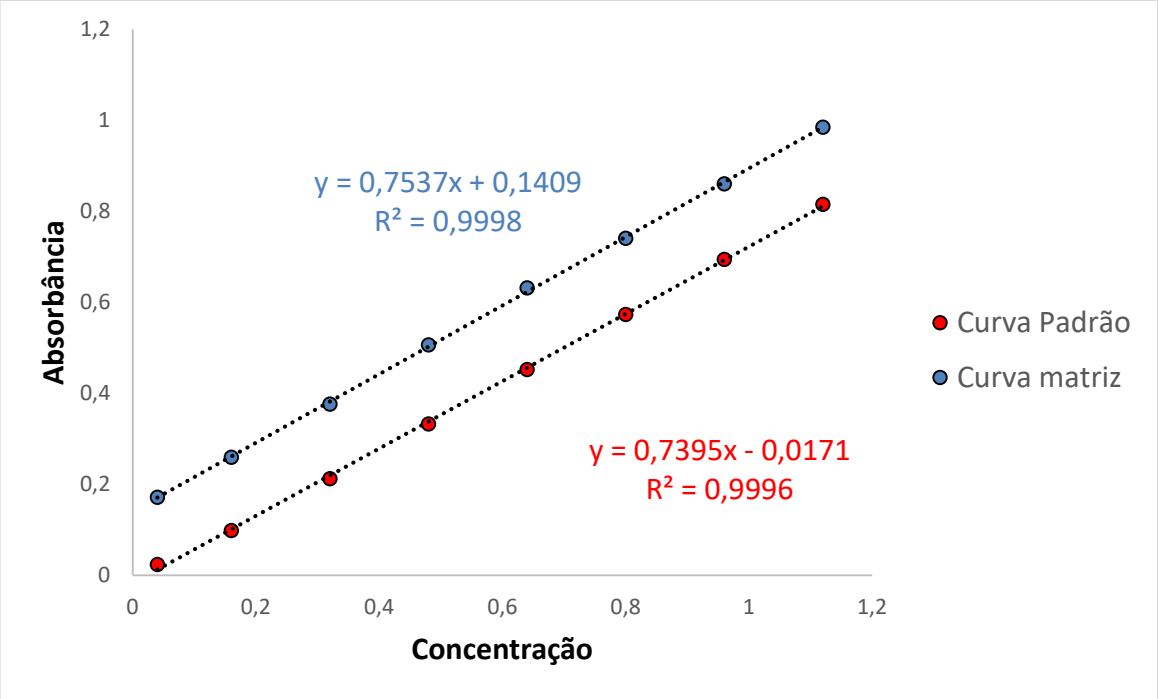
Figura 19 – Curva intervalo linear dinâmico.



Na análise de efeito de matriz, as duas inclinações das curvas padrão (soluções padrão) e curva matriz (soluções padrão + quantidade solução da amostra) são comparadas, através da aplicação do teste *t*, porém, para definir o tipo de teste *t* a ser empregado realizou-se o teste *F*. Se o *F* calculado for menor que o *F* tabelado, não há diferença significativa entre as variâncias, e neste caso, a matriz não afeta a precisão do método, e neste caso também, recomenda-se a aplicação do teste *t* para variâncias equivalentes; caso contrário, se o *F* calculado for maior que o F tabelado, recomenda-se a aplicação do teste t para variâncias diferentes, se o t calculado for menor que o t tabelado, diz-se que não há efeito de matriz [46], [49], [52].

Há uma relação paralela entre as curvas, conforme a Figura 20, indicando que não há efeito de matriz. Porém, o resultado concreto se deu através do teste *t*.

Figura 20 – Avaliação do efeito matriz.



A inclinação da curva padrão foi 0,7395 e da curva matriz foi 0,7537. As inclinações não são iguais, porém são estatisticamente semelhantes a nível de confiança de 95%, estabelecendo uma razão padrão/matriz de 0,98, ou seja, a diferença entre elas é de apenas 2%, o que significa dizer que a matriz interfere na ordem de 2%. Porém, não é uma interferência considerável. No teste *F*, conforme Tabela 11, o *F* calculado foi maior que o *F* crítico, logo o teste *t* foi aplicado para variâncias distintas.

Tabela 11 - Teste-F: duas amostras para variâncias.

	Curva padrão	***Curva nitrito***
Média	0,400679167	0,56675
Variância	0,080635422	0,083744503
Observações	8	8
Graus de liberdade (gl)	7	7
Teste F	0,962874204	
F crítico	0,264058226	

NOTA: Gerada pelo Microsoft Excel®

O teste *t*, conforme Tabela 12, demonstrou que a hipótese de diferença da média, ou melhor, a hipótese do efeito de matriz é nula (0), ou seja, não há efeito de matriz. Isso significa dizer que a matriz amostral não causa interferência no método.

Tabela 12 - Teste t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.

	Curva padrão	***Curva matriz***
Média	0,400679167	0,56675
Variância	0,080635422	0,083744503
Observações	8	8
Hipótese da diferença de média	0	
Grau de liberdade	14	
t crítico uni-caudal	1,761310136	
t crítico bi-caudal	2,144786688	

NOTA: Gerada pelo Microsoft Excel®

Neste trabalho não foi avaliado quais as principais substâncias e suas respectivas concentrações que poderiam interferir nas análises. Porém, as principais interferências [42] estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13 – Estudo de seletividade.

Íon	**Sal**	**Concentração limite (µg/mL)**	
		Nitrato	**Nitrito**
Cl^-	NaCl	30.000	30.00
Mg^{2+}	$MgSO_4$	75	75
NH_3-N	$(NH_4)_2SO_4$	80	80
Ca^{2+}	$CaSO_4$	240	240
Fe^{3+}	$FeCl_3$	30	30
PO_4^{3-}	KH_2PO_4	50	50

FONTE: KAMPHAKE e COHEN, 1967.
NOTA: Tabela modificada.

Os parâmetros observados nesta metodologia estão descritos na Tabela 14, logo abaixo.

Tabela 14 – Parâmetros analíticos do método.

Parâmetros	
	Metodologia de quantificação
Linearidade (µg/mL)	40-1120 µg/L
Faixa dinâmica linear (µg/mL)	320-1120 µg/L
LD (µg/mL)	10 µg/L
LQ (µg/mL)	30 µg/L
Precisão - média do RSD (8 níveis com 3 repetições)	1,14 %

3.4 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO POR FIA

Na otimização da metodologia com o emprego do sistema FIA alguns aspectos foram levados em consideração, como: tamanho da bobina de reação; tamanho da alça de amostragem; e velocidade de rotação e vazão da amostra e dos reagentes.

Porém a otimização foi feita apenas com o tamanho da alça; velocidade de rotação; e concentração dos reagentes. Considerando um valor fixo do tamanho de bobina de reação de 130 cm e 0,2 cm de diâmetro. Sendo assim, o tempo de interação dos reagentes e amostras dentro da bobina foi definido mediante velocidade de rotação do sistema de injeção em fluxo (bomba peristáltica).

A vazão da amostra e dos reagentes podem ser controladas também pelos tamanhos dos tubos flexíveis (silicone), que aumentam a vazão da amostra quando em maior pressão. A pressão pode ser medida pelo comprimento dos tubos, onde quanto menor o tubo, maior a pressão do sistema, e consequentemente, maior a vazão. Porém, o desgaste dos tubos é maior quando em maior pressão. Sendo assim, optou-se por estabelecer um único comprimento de tubo que promovesse uma boa vazão, mas também, evitasse desgastes rápidos.

A Tabela 15 expressa os resultados obtidos na otimização da vazão da amostra no sistema.

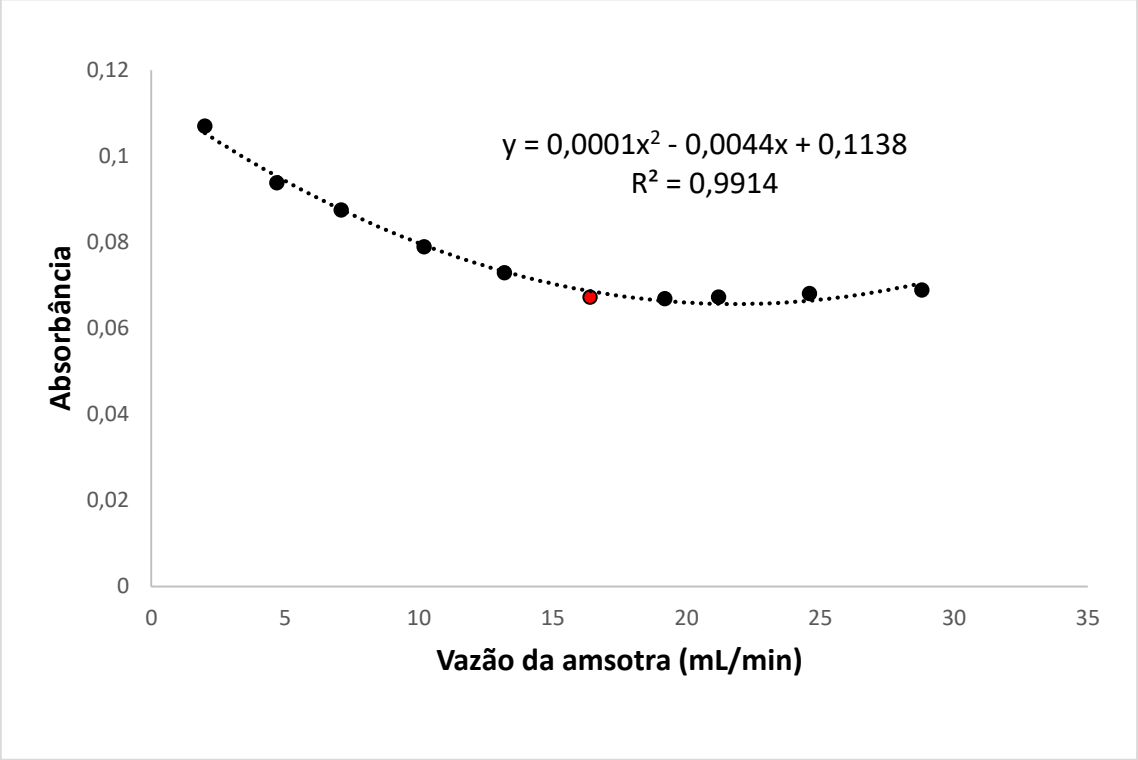
Tabela 15 - Resultados encontrados no processo de otimização das vazões de amostras, mantendo as concentrações de sulfanilamida e NED fixas.

Experimentos	Vazão da amostra (mL/min)	Absorbância	DPR (%)
01	2,0	0,1070*	1,5
02	4,7	0,0938*	0,8
03	7,1	0,0874*	0,7
04	10,2	0,0789	0,6
05	13,2	0,0729*	1,4
06	16,4	0,0672	3,4
07	19,2	0,0668	3.1
08	21,2	0,0672	1,5
09	24,6	0,0680	1,5
10	28,8	0,0688	1,4

Nota: n = 3 e *n =2

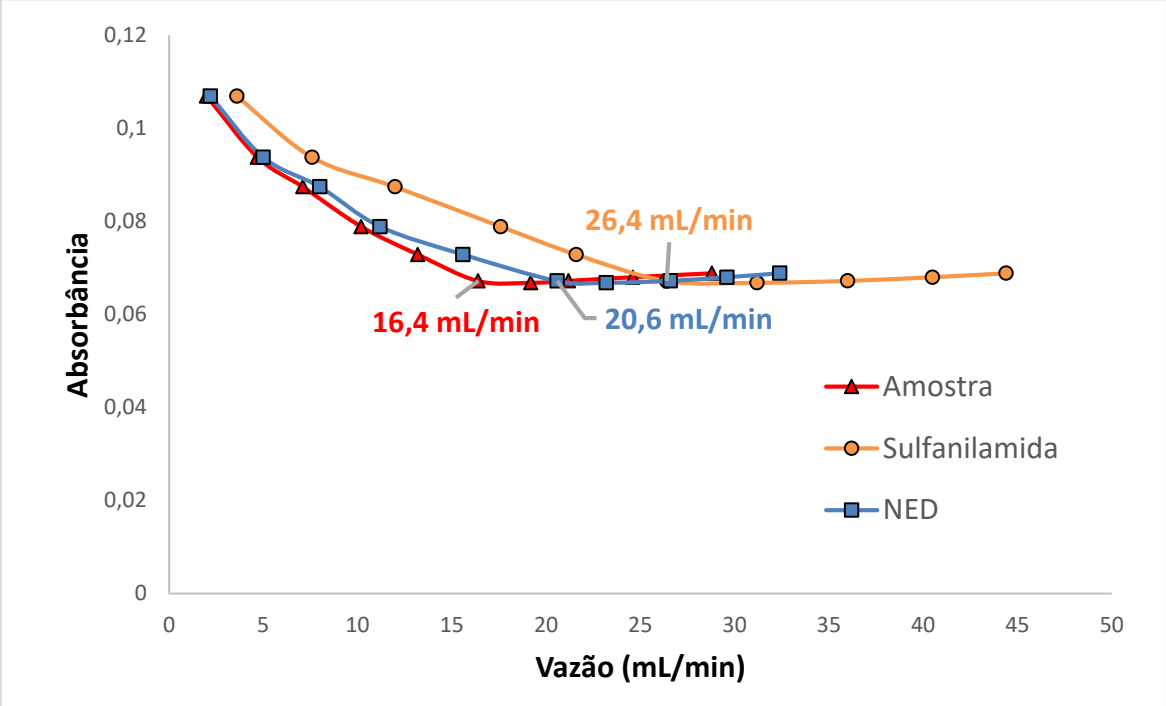
De acordo a Tabela 15, o desvio padrão relativo variou entre 0,6 a 3,4%, ou uma média aproximada de 1,6%. Esse desvio padrão relativo indica precisão entre os resultados, sendo que resultados não são precisos quando o desvio padrão relativo for superior a 5,0 % [25], [46]. Com os dados da mesma Tabela 15 foi possível obter os gráficos contidos na Figura 21 e 22. A figura 21 expressa a relação entre a absorbância e a vazão da amostra.

Figura 21 - Otimização da vazão da amostra, utilizada também como solução carreadora, para quantificação de nitrito via sistema FIA.



Através da Figura 21, observa-se que a maior absorbância é gerada em velocidade de rotação é de 2,0 mL/min, porém, o ponto escolhido para o trabalho foi de 16,4 mL/min. Esta escolha foi feita pois em vazões abaixo de 16,4 mL/min, as bandas ou picos de absorção apresentavam muitos ruídos intensos devido as pulsações geradas pela bomba peristáltica, que geralmente são maiores quando as bombas trabalham em velocidades menores; e em vazões maiores que 16,4 mL/min, os ruídos eram mais brandos e similares aos de 16,4 mL/min, então considerou a vazão de 16,4 mL/min, pois gera menos desgastes dos tubos flexíveis(menor pressão), e também porque utiliza menor quantidade de reagentes e amostra por minuto, como mostra a Figura 22.

Figura 22 - Relação entre a absorbância e as vazões de amostra e dos reagentes em pregados no sistema FIA.



As vazões da amostra e dos reagentes são diferentes (vazão de amostra; sulfanilamida; e NED, foram, respectivamente, 16,4; 20,6 e 26,4 mL/min). Este fato deve-se pela diferença entre os tamanhos dos tubos flexíveis e também pelo ajuste de pressão gerada pelas placas de compressão.

Em relação à otimização do tamanho da alça de amostragem, a ideia inicial era utilizar alça para pré-injeção da amostra utilizando os reagentes como elementos carreadores (método padrão do FIA), porém, nos testes feitos, averiguou-se que, com a pré-injeção dos reagentes utilizando a amostra como elemento carreador (método reverso do FIA), o sinal analítico era maior, por isso, preferiu-se utilizar a alça para pré-injeção dos reagentes ao invés da amostra. A Tabela 16 expressa os resultados obtidos no processo de otimização.

Tabela 16 - Resultados obtidos no processo de otimização do tamanho da alça de amostragem no sistema FIA.

Experimentos	Tamanho do loop (cm)	Absorbância	DPR (%)
01	10	0,0175	2,4
02	15	0,0356	3,0
03	20	0,0390	0,2
04	25	0,0564	2,9
05	30	0,0616	1,9
06	40	0,0660	2,1
07	45	0,0723	1,2

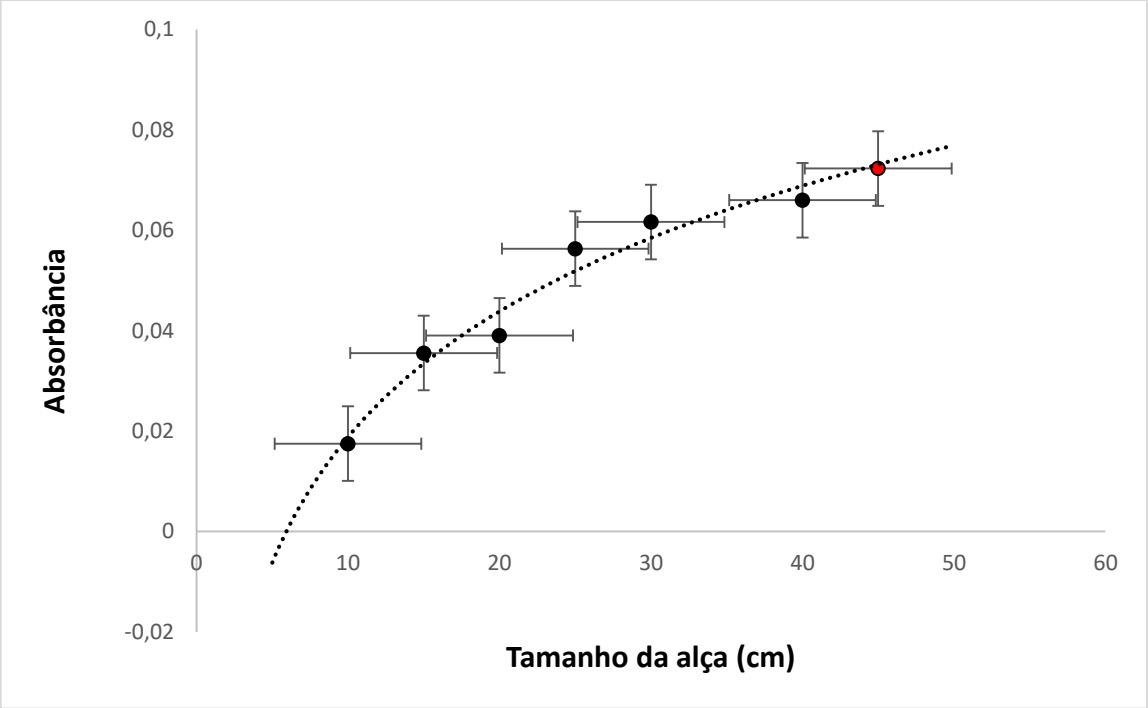
Nota: n = 2

Considerando que a precisão entre os resultados dar-se por um desvio padrão relativo menor que 5%, tem-se que neste teste houve também precisão entre os resultados, uma vez que o desvio padrão relativo variou entre 0,2 a 3,0%.

Com os resultados expressos na Tabela 16 foi possível obter a Figura 23, que faz relação entre a absorbância e o tamanho do loop. Percebe-se que a medida que aumenta o tamanho do loop aumenta-se também o sinal. Então considerando que esta curva tenha uma tendência logarítmica, logo, se tivesse tamanhos maiores de loop, certamente os sinais seriam maiores, claro que até um certo ponto, pois a tendência não é linear.

O tamanho de alça selecionado foi de 45 cm, tendo em vista que foi a de maior comprimento entre as testadas e que obteve maior sinal analítico.

Figura 23 -Relação entre o tamanho da alça e a absorbância no sistema FIA.



Uma visão geral da otimização do sistema de injeção em fluxo para análise do íon nitrito está descrita na Tabela 17.

Tabela 17 - Parâmetros instrumentais utilizados no sistema FIA.

Parâmetros	
Vazão da amostra	16,4 mL/min
Bobina de reação	130 cm x 0,2 cm de diâmetro
Cubeta de fluxo	0,1 cm

Após foi realizada a otimização das concentrações que se enquadrariam melhores no sistema otimizado. Neste processo, a consideração inicial era promover a análise multivariada, porém, neste tipo de análise não dá para considerar ruídos ou deformações de bandas ou picos, considera-se apenas os sinais analíticos oriundos da interação entre os reagentes e a amostra. Sendo assim, trabalhou-se com análise univariada.

Um dos primeiros aspectos considerado foi a proporção entre as concentrações de Sulfanilamida e NED, pois em análises prévias, observou-se que havia diferenças significativas

quando concentrações diferentes de sulfanilamida interagiam de maneira diferente com uma mesma concentração de NED.

A Tabela 18 mostra os resultados obtidos pela interação proporcional entre os reagentes.

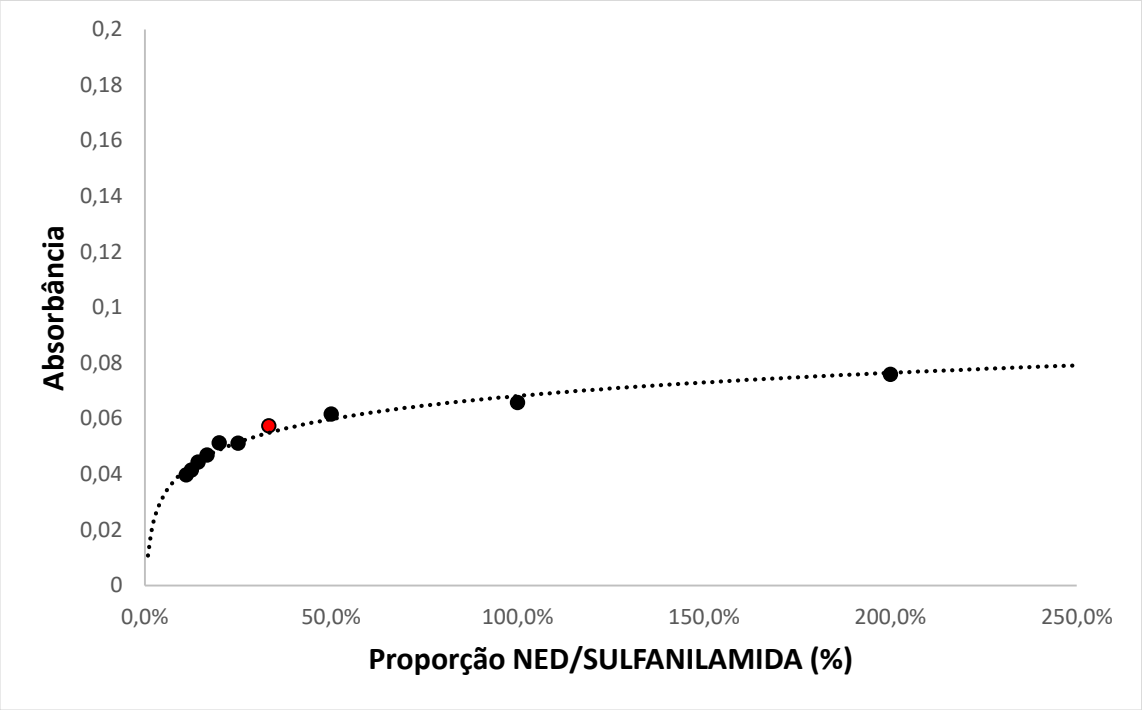
Tabela 18 - Resultados obtidos no processo de otimização das melhores proporções entre as concentração NED/Sulfanilamida no sistema FIA.

Experimentos	Proporção NED/SULFANILAMIDA (%)	Absorbância	RSD (%)
01	11,1	0,0398	7,0
02	12,5	0,0416	2,4
03	14,3	0,0444	4,5
04	16,7	0,0470	2,2
05	20,0	0,0513	3,5
06	25,0	0,0512	2,7
07	33,3	0,0574	4,2
08	50,0	0,0616	3,3
09	100,0	0,0658	3,7
10	200,0	0,0760	0,4

Nota: n = 3

Como previsto, as diferentes proporções geram também diferentes sinais analíticos. Melhores conclusões podem ser tiradas a partir da Figura 24. O desvio padrão relativo variou de 0,4 a 7,05 com valor médio de 3,4% (valor dentro faixa aceitável de precisão).

Figura 24 - Otimização razão NED/SULFANILAMIDA no sistema FIA.



De acordo com a figura 24, quanto maior a proporção de NED/SULFANILAMIDA, maior também o sinal analítico. O maior sinal que se pode observar foi de proporção de 200%, porém, a utilização dessa proporção gera muitos ruídos e diminui a precisão do sistema por efeito de memória. Logo, escolheu-se a proporção de 33,3%, que não gera ruídos significativos e não contribui muito para o efeito de memória, sem falar que foi uma das proporções com maiores sinais analíticos, e aumentar a proporção a partir daí não valeria a pena, tendo em vista a pequena variação posterior.

Após a definição da proporção entre os reagentes, foi feito da concentração de cada reagente, considerando a proporção definida anteriormente. A Tabela 19 a seguir traz alguns resultados.

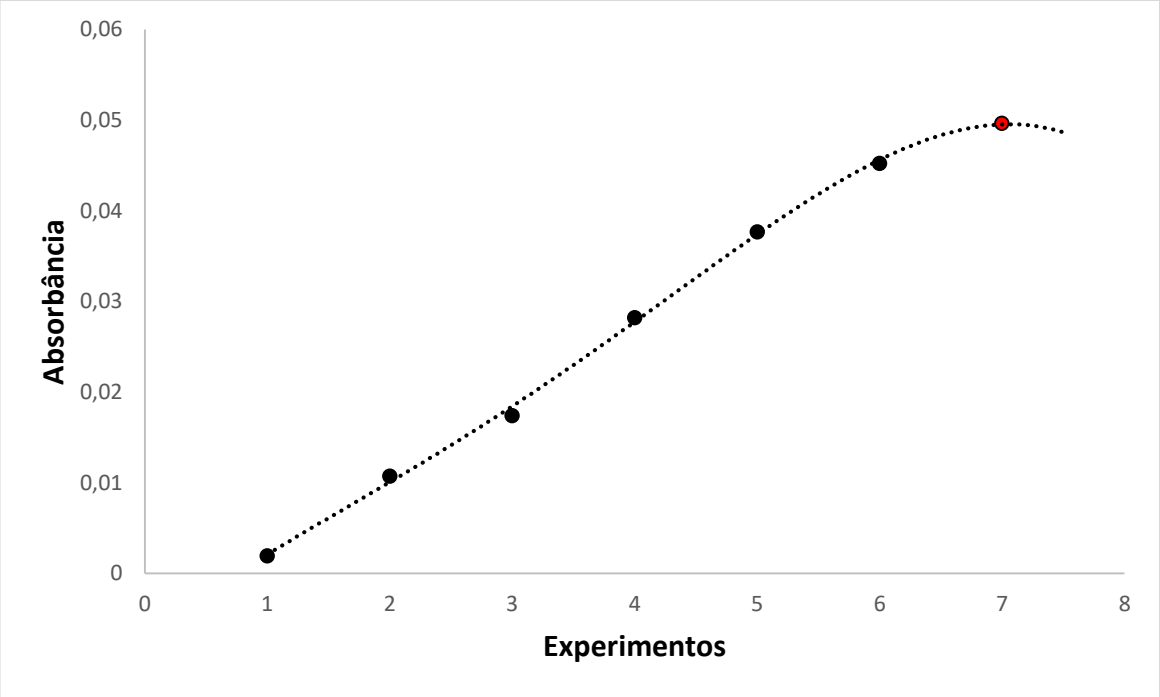
Tabela 19 - Resultados do processo de otimização das concentrações de NED e Sulfanilamida no sistema FIA.

Experimentos	Concentração de NED (%m/v)	Concentração de Sulfanilamida (%m/v)	Absorbância	RSD (%)
01	0,0033	0,0100	0,0019	3,0
02	0,0167	0,0500	0,0107	3,5
03	0,0333	0,1000	0,0174	4,9
04	0,0667	0,2000	0,0282	3,6
05	0,1002	0,3000	0,0377	4,1
06	0,1334	0,4000	0,0452	3,2
07	0,1667	0,5000	0,0496	2,8

Nota: n =3

O desvio padrão relativo variou de 2,8 a 4,9% com média de 3,6% (dentro faixa aceitável). Os resultados da Tabela 19 podem ser melhor interpretados com a curva expressa na Figura 25. A curva foi melhor ajustada utilizando a tendência polinomial de 4º grau. Seguindo a tendência da curva, o melhor ponto para ser utilizado nesta metodologia é o experimento 7 que corresponde as concentrações de 0,1667 e 0,5000 %(m/v) para NED e Sulfanilamida, respectivamente. E, como não foi encontrado nenhuma objeção (ruídos, etc.) quanto a essas concentrações; elas foram consideradas como ótimas para o sistema.

Figura 25 - Otimização das concentrações de NED e Sulfanilamida no sistema FIA.



Após a definição das concentrações a serem utilizadas, fez-se a curva de calibração. A curva foi feita com 9 pontos, variando de 0,05 a 0,70 µg/mL. A Tabela 20 traz os resultados encontrados. E de acordo com ela, o desvio padrão variou de 0,8 a 5,9 % com valor médio de 2,6% (dentro da faixa aceitável).

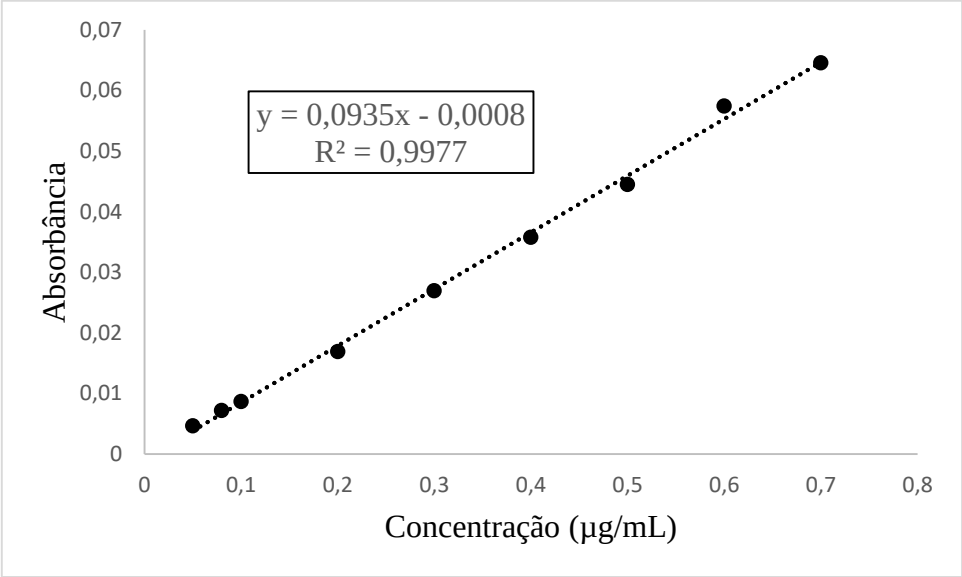
Tabela 20 - Resultados da curva de calibração no sistema FIA.

Experimentos	Concentração (µg/mL)	Absorbância	RSD (%)
01	0,05	0,0047	1,2
02	0,08	0,0072	1,4
03	0,10	0,0087*	1,6
04	0,20	0,0169*	0,8
05	0,30	0,0269	3,2
06	0,40	0,0358	1,5
07	0,50	0,0445	3,0
08	0,60	0,0574	4,8
09	0,70	0,0646*	5,9

NOTA: n = 3 e *n = 2.

A Figura 26 expressa melhor os resultados dessa curva de calibração. A ANVISA recomenda que o R^2 seja igual a 0,99 [46], pois demonstra linearidade da curva, neste trabalho o R^2 obtido foi de 0,9977. Apesar de ser um coeficiente de determinação recomendado, o coeficiente obtido não revela evidência de ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. Isso talvez se deva por conta dos altos desvios padrões relativos, que talvez estejam relacionados com a baixa sensibilidade da curva, observado pela inclinação da mesma.

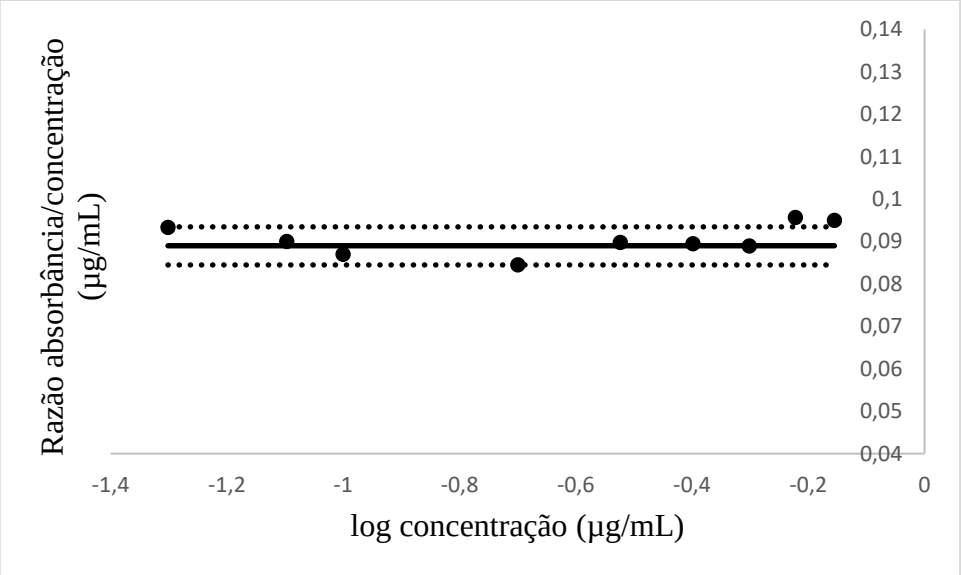
Figura 26 - Curva de calibração para o sistema FIA.



Ainda referente a curva de calibração acima, pode-se encontrar o Limite de Detecção (Equação 6) e Limite de Quantificação (Equação 7) do método [46]. Sendo assim, o LD e LQ foram, respectivamente, 2,0 e 5,0 µg/L ou 0,12 e 0,37 mg/kg.

Outra questão a ser observada aqui é a diferença entre a faixa de concentração e faixa linear dinâmica. A faixa de concentração foi a faixa de aplicação na construção da curva analítica, e analisando o R^2 tem-se que essa faixa apresenta linearidade, porém, não significa dizer que todos os pontos estão realmente dentro de uma faixa linear dinâmica [46]. Para encontrar a faixa linear dinâmica, proposta por August et al, foi construída uma curva relacionando as respostas relativa (absorbância/concentração) e o logarítmico da concentração. Nesta curva, Figura 27, foram desenhadas outras linhas horizontais paralelas para 95 e 105 % da linha da faixa linear [46]. A faixa linear dinâmica encontrada foi de 50 a 500 µg/L.

Figura 27 - Curva intervalo linear dinâmico para o sistema FIA.



A Tabela 21 aborda alguns parâmetros comparando a metodologia convencional de determinação de nitrito com o sistema FIA.

Comparando as duas metodologias, conforme Tabela 21, ambas têm suas vantagens e desvantagens em relação uma a outra. Como por exemplo, o fator de correlação do método convencional é maior que no FIA, o que significa dizer que o método convencional é mais preciso; o coeficiente angular do método convencional é maior que no FIA, o que significa que ele é mais sensível, e a sensibilidade interfere na precisão, exatidão, e até mesmo, na avaliação de interferentes; por outro lado, o sistema FIA é mais rápido em termos de análise, tem menores limites de quantificação, o que significa dizer que ele pode trabalhar com um número mair de amostras e em menos tempo, e também com amostras menos concentradas; a quantidade de amostra e reagentes no sistema FIA também é menor.

Tabela 21 - Comparação entre os parâmetros da metodologia convencional e do sistema FIA.

Parâmetros	Metodologia	
	Convencional	**FIA**
Equação da regressão linear	0,7395x - 0,0171	0,0935x - 0,0008
Coeficiente de determinação R^2	0,9996	0,9977
Linearidade (µg/L)	40-1120	50-700
Faixa dinâmica linear (µg/L)	320-1120	50-500
LD (mg/kg)	1,1	3,3
LQ (mg/kg)	0,12	0,37
Precisão RSD médio (8 níveis com 3 repetições)	1,14 %	2,60 %
Velocidade analítica	4 análises h^{-1}	60 análises h^{-1}
Concentração dos reagentes		
Sulfanilamida	0,5 % (m/v)	0,5 % (m/v)
NED	0,1 % (m/v)	0,167 % (m/v)
Consumo de reagentes por análise		
Sulfanilamida	7,0 mL	0,20 mL
NED	4,0 mL	0,16 mL
Amostra	10,0 mL	4,1 mL

NOTA: - não foi avaliado.

Entre os dois métodos o que se escolheria para ser trabalhado em projetos posteriores seria o sistema de injeção em fluxo.

Ainda em termos de comparação, a tabela 22 abaixo traz um paralelo da determinação de íon nitrito em amostras de linguiça do tipo frescal de marcas e sabores diferentes, utilizando o método convencional e o método com o acoplamento do sistema FIA.

Tabela 22 - Determinação de nitrito em amostras de linguiça do tipo frescal pelo método convencional e pelo sistema FIA.

Amostras de Linguiça	Convencional	Sistema FIA
	Concentração (mg/kg) ± RSD (%)	
Frango	7,5 ± 0,7	8,1 ± 6,2
Carne	5,2 ± 4,9	4,9 ± 5,3
Mista	263,0 ± 5,1	267,0 ± 6,4

Nota: n = 3.

Os resultados concordam entre si, variando em uma proporção de 5,2 a 7,4 %. E comparando os valores encontrados com as concentrações estabelecida pelos órgãos supervisores, tem-se uma variação de 4,9 a 267,0 mg/kg de nitrito de sódio, sendo que o estabelecido pela ANIVISA é de 150 mg/kg. E dentre os 3 sabores, a linguiça mista está fora do recomendado pelos órgãos regulamentadores. Aplicando o teste t pareado para as duas médias que estão fora do regulamento, a hipótese é nula (o), o que significa que não diferença significativa entre as duas médias.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A otimização de um sistema foi extremamente importante, uma que vez que estabelece uma metodologia cujos resultados se aproximam do valor real. No processo de extração do íon nitrito, por exemplo, não sabe-se ao certo qual o teor real de nitrito na amostra, porém, com a metodologia otimizada, sabe-se que os resultados encontrados são os mais próximos possíveis do real. Outro fator a ser observado em relação a otimização, é que a metodologia otimizada, pode ser considerada como um modelo padronizado a ser seguido, como por exemplo, nos testes feitos com a coluna de cádmio, seguindo o mesmo procedimento deste trabalho, obtêm-se resultados satisfatórios e próximo do real.

Na comparação entre os dois sistemas (convencional e FIA), tem-se que o sistema FIA aplicado a técnica espectrofotométrica é superior ao convencional do ponto de vista prático e econômico, e apesar dele apresentar baixa sensibilidade e ser menos preciso que o convencional, ainda assim é eficiente, econômico, prático e preciso (RSD abaixo de 5 %).

Para trabalhos futuros, planeja-se validar uma metodologia automatizada (sistema em fluxo) para promover a redução de íons nitrato a nitrito, para posterior análise em linha com o método otimizado neste trabalho na determinação e quantificação em diversos tipos matérias cárneos.

REFERÊNCIAS

[1] FIB – Food Ingredientes Brasil. Segurança Alimentar. Nº 4, 2008. 32-43 p.

[2] BRASIL. **Conselho Nacional de Meio Ambiente**. Resolução n° 20, de 18 de junho de 1986. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 jul. 1986.

[3] BRASIL. **Fundação Nacional de Saúde**. Portaria nº 1469 de 29 de dezembro de 2000. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 32p.

[4] BENEVIDES, Cicília Maria de Jesus; et al. **Fatores Antinutricionais em alimentos**: revisão. Segurança Alimentar e Nutricional, 18(2); Campinas, 2011. p. 67-79.

[5] CONAB. **Consumo per-capita de carnes no Brasil**. Disponível em: https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/noticia/2017/07/consumo-capita-de-carnes-no-brasil-e-o-menor-em-oito-anos.html Acesso em maio de 2017.

[6] PEIXOTO, E. M. A. **Elemento Químico**: Nitrogênio. Química Nova na Escola, n. 6, 1997, p. 34.

[7] SANTOS, Juracir Silva. **Desenvolvimento e otimização de metodologia para determinação de nitrogênio**. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

[8] JÚNIOR, G. B. A; et al. **Estudo de espécie de fósforo e nitrogênio em lagoas de estabilização**. In: Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 27, Fortaleza, 2000. Anais. V. III.

[9] MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. **Detection e determination of nitrate and nitrite**: a review. Talanta, v. 54, p. 785-8-3, 2001.

[10] MORGANTE, P. G. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio**. Disponível em: http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/MetNitro.htm#topico7. Acesso em: Maio de 2017.

[11] TOVAR, A., et al. **A simple automated method for the speciation of dissolved inorganic nitrogen in seawater**. Analytica Chimica, Acta 2002.

[12] KUILA D. K., CHAKRABORTTY A., SHARMA S. P. e LAHIRI S. C. **Composition profile of low explosives from cases in India**. Forensic Science International, v. 159, n. 2-3, p. 127-131, 2006.

[13] VALIZADEH H. e SHOMALI A. **A new nitrite ionic liquid (IL-ONO) as a nitrosonium source for the efficient diazotization of aniline derivatives and in-situ synthesis of azo dyes**. **Dyes and Pigments**, v. 92, n. 3, p. 1138-1143, 2012.

[14] SEBRANEK J. G. e BACUS J. N. **Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?** Meat Science, v. 77, n. 1, p. 136-147, 2007.

[15] KILIC, B. **Residual nitrite**: a concern in cured meat products. Meat processing, v.39, p.40-41, 2000.

[16] DESROSIER, N.W.; DESROSIER, J. N. **The technology of food preservation**: 4. ed. Wesport-connecticut: Avi Publishing Company, 1977. 558p.

[17] HARDISSON, A.; GONZÁLEZ PADRÓN, A.; FRÍAS, I.; REGUERA, J. I. **The Evaluation of the Content of Nitrates and Nitrites in Food Products for Infants**. Journal of food composition and analysis, v .9, p.13-17, 1996.

[18] OKAFOR, P. N., OGBONNA, U. I. **Nitrate and nitrite contamination of water sources and fruit juices marked in South-Eastern Nigeria**. Journal of Food Composition and Analysis, v. 16, p. 213-218, 2003.

[19] RESENDE A.V. **Agricultura e qualidade da água**: contaminação da água por nitrato. Documento 57. ISSN 1517 5111. Editora EMBRAPA, Planaltina - DF, 2002.

[20] BRASIL. **Ministério da agricultura e abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Oficializa os métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes. Instrução Normativa, n. 20, 1999.

[21] ZUBLEMA, J. P.; COOK, M. G.; ST CLAIR, M. B. **Pollutants in groundwater: health effects**. Disponível em: http://ces.soil.ncsu.edu/soilscience/publications/soilfacts. Acesso em: 16 mar. 2016.

[22] BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.

[23] SILVA, D. F.; et al. **Análise de Nitrato e Amônio em Solo e Água**. Documento 114. ISSN 1518 4277. Editora EMBRAPA, Sete Lagoas – MG, 2010.

[24] MACHADO, Genikelly Cavalcanti. **Determinação sequencial de nitrato e nitrito por voltametria de pulso diferencial empregando um ultramicroeletrodo de outro**. Tese de Mestrado em Ciências. Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, 2010.

[25] HILL, A. R. C.; REYNOLDS, S. L. **Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds**. Analyst, v. 124, n. 6, p. 953-958, 1999.

[26] YANG, J.E.; SKOGLEY, E.O.; SCHAFF, B.E.; KIM, J.J. **A Simple Spectrophotometric Determination of Nitrate in Water, Resin, and Soil Extracts**. Soil Sci. Soc. Am. J. 62. 1998, p. 1108.

[27] LOPES, Mariângela Vieira. **Desenvolvimento de procedimentos e sistemas automatizados para controle de qualidade de carnes e produtos cárneos**. Tese de doutorado, UFBA, Instituto de química, Salvador-BA, 2005.

[28] REIS, Boaventura Freire dos. **Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento**. Artigo de revisão; Química Nova 1996, 19(1), p. 51-58.

[29] REIS, Boaventura F.; et. al. **A análise química por injeção em fluxo contínuo**. Química Nova 1989, 12(1), p.82-91.

[30] LEMOS, Valfredo Azevedo; BEZERRA, Marcos de Almeida. **Análises químicas por sistemas de injeção em fluxo**. Edições UESB. Vitória da Conquista-BA, 2017.

[31] SKOOG, Douglas A.; et. al. **Fundamentos de química analítica**. Editora Thomson, 8ª edição, 2006.

[32] FERREIRA, G. F. T. M. **Desenvolvimento de Procedimentos de Análise por Injeção em Fluxo para a Determinação de Amônio e Nitrito em Águas**. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal da Grande Dourados – Ciência e Tecnologia Ambiental. Dourados – MS, 2013.

[33] IAL. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. Instituto Adolfo Lutz, 4ª edição e 1ª edição digital, São Paulo-SP, 2008.

[34] LARA, Walkíria H.; TAKAHASHI, Mickiko Y. **Determinação espectrofotométrica de nitritos e nitratos em sais de cura**. Revista Instituto Adolfo Lutz, 34. 1974, p. 35-39.

[35] ROCHA, Caroline O. da; et al. **Methylene violet 3 RAX Dye as a new reagente for the determination of nitrite in cured meats abd vegetables**. J. Braz. Chem. Soc., vol. 28, n. 8. 2017, P. 1528-1533.

[36] SOARES, M. Inês Valente; et al. **Determinação de nitratos e nitritos**: Ultravioleta. Revista Portuguesa de Química, 13. 1971, p. 151-162.

[37] MANTOVANI, José Ricardo; et al. C**omparação de procedimentos de quantificação de nitratos em tecido vegetal**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, vol. 40, n. 1. 2005, p. 53-59.

[38] CETESB. Disponível em: http://www.cetesb.SP.gov.br. Acesso em: Janeiro de 2018.

[39] EPA. **Method 352.1**: nitrogen, nitrate (colorimetric, brucine) by spectrophotometer. Evironmental Protection Agency, Estados Unidos. 1971.

[40] JOHNSON, William Stewart. **The determination of nitrates in polluend stream and sewage samples with brucine sulfate using the brucine technique**. Tese de Mestrado em Químca, Georgia Institute of Technology. 1948.

[41] MELCHERT, Wanessa Roberto. **Desenvolvimento de procedimentos analíticos limpos em sistemas de análises em fluxo para determinação de espécies de interesse ambiental**. Tese de Mestrado em Química, Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, 2005.

[42] KAMPHAKE, L. J.; HANNAH, S. A.; COHEN, J. M. **Automed analysis for nitrate by hydrazine reduction**. Water Research, vol. 1. 1967, p. 205-216.

[43] SAWICKI, Carole R.; SCARINGELLI, Frank P. **Colorimetric determination of nitrate after hydrazine reduction to nitrite**. Microchemical Journal, 16. 1971, p. 657-672.

[44] SILVA, L. A. KORN, M.; ANDRADE, J. B. de. **Influence of ultrasonic waves in the reduction of nitrate to nitrite by hydrazine-Cu(II)**. Ultrasonics Sonochemistry. v. 14, n. 2, p. 275-280, 2007.

[45] WIRKNER, Felicitas M. **Determinação do conteúdo total de nitrato em soluções de tório por meio de eletrodo seletivo**: aplicação na unidade piloto de purificação de tório. Tese de Mestrado em Química, Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, 1979.

[46] RIBANI, M. et. al. **Validação em métodos cromatográficos eletroforéticos**. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780. 2004.

[47] FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. I ed. Salvador: Vento Leste, 2015, 190 p.

[48] SANTOS, W. N. L.; SANTOS, C. M. C.; FERREIRA, S. L. C. **Application of three-variables Doehlert matrix for optimisation of an on-line pre-concentration system for zinc determination in natural water samples by flame atomic absorption spectrometry**. Microchemical Journal, v.75, n.3, p. 211-221, 2003.

[49] LEITE, Flávio. **Validação em análise química**. Editora Átomo, 5ª edição, Campinas-SP, 2008.

[50] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. Química nova, v.29, n.2, p. 338-350, 2006.

[51] ANIVSA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE nº 899, 2003.

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

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

[53] EDUCABRAS. **Ciclo do Nitrogênio**. Disponível em: https://www.educabras.com/ensino_medio/materia/biologia/ecologia/aulas/o_ciclo_do_nitrogenio. Acesso em: maio de 2017.

[54] Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Technical Report Series 859 – **Evaluation of certain food additives and contaminants**. 44th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; 1996.

[55] HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. LTC Editora, 5ª edição, Rio de Janeiro-RJ, 2001.

[56] HONIKEL, K.O. **The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products**. Meat science, v. 78, n. 1-2, p. 68–76, 2008.

[57] INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**. DOQ-CGCRE-008, 2003.