

Mayara da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE
NITRATO, NITRITO E TIOCIANATO EM AMOSTRAS DE
LEITE E EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA POR
ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA, EMPREGANDO
CAPILAR DE SÍLICA REVESTIDO COM SAL DE QUITOSANA
QUATERNIZADA**

Dissertação de Mestrado submetida ao
programa de Pós Graduação em
Química da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Química.
Orientador: Prof. Dr. Luciano Vitali.

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Mayara da

Desenvolvimento de método de análise de nitrato, nitrito e tiocianato em leite bovino, caprino e extrato hidrossolúvel de soja por eletroforese capilar de zona, empregando capilar de sílica não revestido e revestido com sal de quitosana quaternizada. / Mayara da Silva ; orientador, Luciano Vitali - Florianópolis, SC, 2017.

111 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Eletroforese capilar de zona. 3. Capilar revestido. 4. Leite e extrato hidrossolúvel de soja. 5. Validação analítica. I. Vitali, Luciano. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Mayara da Silva

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE NITRATO, NITRITO E TIOCIANATO EM AMOSTRAS DE LEITE E EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA, EMPREGANDO CAPILAR DE SÍLICA REVESTIDO COM SAL DE QUITOSANA QUATERNIZADA

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 22 de Fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado,
Coordenador do Curso de Pós-graduação em Química
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luciano Vitali
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina (CFM-UFSC)

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke,
Universidade Federal de Santa Catarina (CFM-UFSC)

Prof. Dr. Thiago Caon,
Universidade Federal de Santa Catarina (CCS-UFSC)

Dr. Heitor Daguer
Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que me permitiu viver este momento.

A Universidade Federal de Santa Catarina em especial ao Programa de Pós-Graduação em Química por ter me dado esta oportunidade.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Luciano Vitali, pela paciência, atenção, dedicação e ensinamentos ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço aos professores Dr. Thiago Caon, Dr. Gustavo Amadeu Micke e Dr. Heitor Daguer por terem aceitado fazer parte da banca examinadora e também por todas as valiosas sugestões. Em especial agradeço ao professor Dr. Gustavo Micke pelos ensinamentos e ajuda em muitos momentos.

Aos colegas do LabEC pelos ensinamentos e carinho. Em especial ao Alex Micke, o qual se tornou um amigo querido no decorrer desta trajetória.

Agradeço de forma especial ao meu namorado e companheiro Fabio Linder, pelo carinho e incentivo para que eu pudesse levar meus estudos adiante, apesar dos momentos difíceis.

Agradeço aos meus pais, pelo amor, carinho e seus ensinamentos.

Aos meus amigos, por estarem do meu lado em todos os momentos da vida. Em especial a Gisele Olivo pelo exemplo de profissional, por ter contribuído com este trabalho e por todo carinho sempre.

Aos colegas do IFSC pelo carinho e compreensão neste momento. Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”

(Thomas Edison)

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano."

(Isaac Newton)

RESUMO

O presente estudo propõe um método rápido para determinação simultânea de nitrato, tiocianato e nitrito em amostras de leite bovino, caprino e extrato hidrossolúvel de soja utilizando eletroforese capilar de zona com procedimento simples de preparo de amostra. O preparo consiste na homogeneização da amostra e precipitação com a adição de acetonitrila, posteriormente realiza-se análise no aparelho de eletroforese capilar. O eletrólito de corrida foi constituído por 30 mmol L⁻¹ ácido aminocapróico e 24 mmol L⁻¹ ácido perclórico (pH 3,85), selecionados com o *software Peakmaster*®. As separações foram conduzidas em capilar de sílica revestido com sal de quitosana quaternizada com comprimento total de 48,5 cm (40 cm efetivo x 75 µm diâmetro interno) com detecção direta na região UV em 210 nm. As amostras foram injetadas por pressão hidrodinâmica de 50 mbar / 40 segundos e tensão de separação de -30 kV. O padrão interno foi o bromato. O tempo de migração médio do nitrato, tiocianato e nitrito foi de 1,50; 1,56 e 1,62 minutos, respectivamente. O método proposto foi validado segundo protocolos de validação de métodos analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC). O método proposto mostrou boa linearidade ($R^2 > 0,99$) na faixa linear estudada de 0,1-4,0 mg L⁻¹ e limite de detecção e quantificação adequados (LD para nitrato, tiocianato e nitrito de 0,03; 0,04 e 0,04 mg L⁻¹, respectivamente e LQ para nitrato, tiocianato e nitrito de 0,05; 0,06 e 0,07 mg L⁻¹, respectivamente). A precisão intra-ensaio considerando área do pico corrigida apresentou coeficiente de variação para nitrato, nitrito e tiocianato de 3,7 a 4,7%; 2,6 a 4,0% e 2,8 a 4,0%, respectivamente. A precisão inter-ensaio considerando área do pico corrigida apresentou coeficiente de variação para nitrato, nitrito e tiocianato de 6,0 a 11,0; 5,0 a 9,7 e 4,7 a 11,0%, respectivamente. A recuperação de três níveis de concentrações de nitrato, tiocianato e nitrito adicionados em amostras mostraram recuperações no leite bovino 82 a 104%, soja 80 a 106% e caprino 92 a 102%. Foi verificado que não há efeito sobre a matriz através de curvas de adição de padrão. O método proposto foi aplicado em doze amostras comercializadas no mercado local. Todas as amostras apresentaram quantidades de nitrito abaixo do limite de detecção. Somente as amostras de leite bovino apresentaram teores de tiocianato quantificáveis de 5,1 a 6,7 mg L⁻¹. Todas as amostras apresentaram quantidades de nitrato quantificáveis de 0,2 a 9,3 mg L⁻¹. A utilização de

capilares revestidos tornou o fluxo eletro-osmótico menos suscetível a variações de pH e reduziu o tempo de análise contribuindo para o bom desempenho analítico do método, considerando-o adequado para implementação como alternativa ao método de referencia brasileiro por espectrofotometria de UV-Visível do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Palavras-chave: Eletroforese capilar de zona. Capilar revestido. Leite.

ABSTRACT

This study proposes a fast method for the simultaneous determination of nitrate, thiocyanate and nitrite in bovine, goat milk samples and water soluble soya extract using capillary zone electrophoresis with a simple sample preparation procedure. The sample preparation consists on the homogenization of the sample and precipitation with the addition of acetonitrile and afterwards the analysis is carried out in the capillary electrophoresis apparatus. The running electrolyte was composed of 30 mmol L⁻¹ of aminocaproic acid and 24 mmol L⁻¹ of perchloric acid (pH 3.85), selected with *Peakmaster*[®] software. The separations were conducted in a fused silica capillary coated with quaternized chitosan salt, presenting a total length of 48.5 cm (40 cm effective x 75 µm internal diameter) and direct detection in the UV region at 210 nm. The samples were injected by hydrodynamic pressure of 50 mbar / 40 seconds and separation voltage of -30 kV. Bromate was used as internal standard. The migration time of nitrate, thiocyanate and nitrite were 1.50; 1.56 and 1.62 minutes, respectively. The proposed method was validated according to the validation protocols of analytical methods of the Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) and Association of Official Analytical Chemists (AOAC). The proposed method showed good linearity ($R^2 > 0.99$) in the studied linear range of 0.1-4.0 mg L⁻¹ and adequate limits of detection and quantification (LD for nitrate, thiocyanate and nitrite of 0.03; 0.04 and 0.04 mg L⁻¹ respectively, and LQ for nitrate, thiocyanate and nitrite of 0.05, 0.06 and 0.07 mg L⁻¹, respectively). The intra-day precision, considering the area of the corrected peak, showed a coefficient of variation for nitrate, nitrite and thiocyanate of 3.7-4.7; 2.6-4.0 and 2.8-4.0%, respectively. The inter-day precision, considering the area of the corrected peak, showed a coefficient of variation for nitrate, nitrite and thiocyanate of 6.0-11.0%; 5.0-9.7% e 4.7-11.0%, respectively. The recovery values for three levels of concentration of nitrate, thiocyanate and nitrite added in samples were 82-104% for bovine milk, 80-106% for soya extract and 92-102% for goat milk, indicating that there is no matrix effect. The proposed method was applied in twelve commercial samples purchased from local market. All samples presented a nitrite levels below the detection limit. Only bovine milk samples had quantifiable thiocyanate contents (5.1-6.7 mg L⁻¹). All samples showed quantifiable amounts of nitrate (0.2-9.3 mg L⁻¹). The use of coated capillaries made the electroosmotic flow less susceptible

to pH variations and reduced the analysis time contributing to the good analytical performance of the method, considering it suitable for implementation as an alternative for the Brazilian reference method by UV-visible spectrophotometry of the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Key words: capillary electrophoresis of zone. coated capillary. milk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representando a instrumentação básica de eletroforese capilar.	37
Figura 2. Representação esquemática da migração de espécies carregadas positivamente em direção ao cátodo em um capilar de sílica fundida.	39
Figura 3. Variação do fluxo eletro-osmótico com o pH em um capilar de sílica fundida.	40
Figura 4. Estruturas de polímeros utilizados para a preparação de revestimentos fisicamente adsorvidos.	43
Figura 5. Estrutura do biopolímero quitosana.	44
Figura 6. Representação da equação química para a obtenção do sal de quitosana quaternizada a partir da quitosana e do cloreto de trimetil glicidil amônio.	44
Figura 7. Curvas de mobilidade do fluxo eletro-osmótico em função do pH, para capilares de sílica fundida não revestido e revestido com o sal de quitosana quaternizada (SAQQ).	45
Figura 8. (a) Representa as regiões do eletrólito e da amostra no capilar as quais durante a aplicação de tensão tem diferentes campos elétricos; (b) migração dos íons na região da amostra imediatamente após a aplicação de tensão, e (c) migração dos íons na região do eletrólito.	47
Figura 9. Esquema representando o sistema utilizado para realizar o condicionamento e revestimento de capilares fora do equipamento de eletroforese capilar.	58
Figura 10. Curvas de mobilidade efetiva versus pH.	68
Figura 11. Otimização dos parâmetros capacidade tamponante, condutividade e força iônica do eletrólito de corrida (BGE) empregando o <i>software PeakMaster</i> ® fixando a concentração de ácido aminocapróico (30 mmol L^{-1}) e variando a concentração de ácido perclórico ($16\text{-}32 \text{ mmol L}^{-1}$). (a) Parâmetros do BGE. (b) Mobilidade efetiva (μef) e dispersão por eletromigração (EMD) versus a concentração de ácido perclórico.	69
Figura 12. Variação da corrente em função da aplicação de tensão para o eletrólito ácido aminocapróico e ácido perclórico, pH 3,85 em diferentes forças iônicas. Entre parênteses estão os valores de coeficientes de determinação (R^2) e teste <i>F</i>	71

Figura 13. Eletroferograma da separação dos analitos em capilar de sílica não revestido (a) simulação utilizando o <i>software PeakMaster</i> [®] e (b) Experimental em matriz de leite com adição dos padrões..	72
Figura 14. Eletroferograma da separação dos analitos em capilar de sílica revestido com sal de quitosana quaternizada (Fluxo eletro-osmótico $31 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (a) simulação utilizando o <i>software PeakMaster</i> [®] e (b) Experimental em matriz de leite com adição dos padrões.	73
Figura 15. Eletroferograma da separação dos analitos em meio aquoso na 1ª corrida e após a 20ª corrida consecutiva. (a) Sem troca de eletrólito e (b) com troca do eletrólito a cada cinco corridas consecutivas.	74
Figura 16. Eletroferogramas obtidos após cinco injeções consecutivas de amostras fortificadas com os padrões injetadas em capilar de sílica revestido com sal de quitosana quaternizada. a) sem o processo de precipitação de proteínas da amostra, b) com o processo de precipitação de proteínas da amostra.	75
Figura 17. Eletroferogramas obtidos após cinco injeções consecutivas de amostras fortificadas com os padrões injetadas em capilar de sílica não revestido a) sem o processo de precipitação de proteínas da amostra, b) com o processo de precipitação de proteínas da amostra.	76
Figura 18. Altura do pico e resolução dos padrões em função do tempo de injeção no estudo de pré-concentração do método proposto para determinação de nitrato, nitrito e tiocianato.	77
Figura 19. Percentagem do capilar de sílica preenchida até o detector com a amostra <i>versus</i> o tempo de introdução da amostra.	78
Figura 20. Medida do fluxo eletro-osmótico <i>versus</i> número de corrida durante a injeção de amostra fortificada com padrões em capilar revestido com sal de quitosana quaternizada..	79
Figura 21. Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva externa aquosa de nitrato, tiocianato e nitrito, utilizando capilar de sílica não revestido.	82
Figura 22. Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva externa aquosa de nitrato, tiocianato e nitrito, utilizando capilar de sílica revestido com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).	83
Figura 23. Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva com adição de padrão na matriz de extrato hidrossolúvel de soja.	86
Figura 24. Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva com adição de padrão na matriz de leite bovino.	87
Figura 25. Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva com adição de padrão na matriz de leite caprino.	88

Figura 26. Eletroferograma da separação dos analitos com aplicação da ferramenta do software *HP ChemStation*[®] para verificação da pureza do pico. (a) Experimental amostra de leite bovino integral aplicada no capilar de sílica não revestido. (b) Experimental ponto 1mg L⁻¹ da curva de calibração externa aplicada no capilar de sílica não revestido. (c) Experimental amostra de leite bovino integral aplicada no capilar de sílica revestido com sal de quitosana quaternizada (SAQQ). (d) Experimental ponto 1 mg L da curva de calibração externa aplicada no capilar de sílica revestido com SAQQ.93

Figura 27. Eletroferogramas simulados no software *PeakMaster*[®] mantendo a concentração de ácido aminocaproico fixada em 30 mmol L⁻¹ e variando a concentração de ácido perclórico de 22 a 25 mmol L⁻¹ para separação dos analitos.....94

Figura 28. Eletroferogramas simulados no software *PeakMaster*[®] mantendo a concentração de ácido perclórico fixada em 24 mmol L⁻¹ e variando a concentração de ácido aminocaproico de 29 a 32 mmol L⁻¹ para separação dos analitos.....95

Figura 29. Eletroferogramas simulados no software *PeakMaster*[®] mantendo a concentração de ácido aminocaproico fixada em 30 mmol L⁻¹ e variando a concentração de ácido perclórico de 23 a 26 mmol L⁻¹ para separação dos analitos.....96

Figura 30. Eletroferogramas simulados no software *PeakMaster*[®] mantendo a concentração de ácido perclórico fixada em 24 mmol L⁻¹ e variando a concentração de ácido aminocaproico de 29 a 32 mmol L⁻¹ para separação dos analitos.....97

Figura 31. Eletroferogramas obtidos empregando o método otimizado a) amostra de leite bovino b) amostra de leite bovino com adição de soluções padrões e c) soluções padrões em água.....105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de pKa e mobilidade eletroforética do nitrato, nitrito, tiocianato, perclorato, bromato e ácido aminocaprílico. Dados obtidos do PeakMaster® software.....	67
Tabela 2. Parâmetros obtidos através de dez injeções consecutivas de soluções padrões em três níveis de concentração (inferior, intermediário e superior), utilizando capilares não revestidos e revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).....	80
Tabela 3. Resultados de linearidade, limites de detecção e quantificação do modelo linear do método otimizado utilizando capilares de sílica não revestidos e revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).....	81
Tabela 4. Valores obtidos no teste de Shapiro-Wilk pra verificar a distribuição normal da curva externa utilizando capilares não revestidos e revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).....	84
Tabela 5. Valores obtidos no teste de Cochran pra verificar a homocedasticidade da curva externa utilizando capilares não revestidos e revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).	84
Tabela 6. Valores de F para verificação do ajuste ao modelo linear para curva externa utilizando capilares não revestidos e revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).....	85
Tabela 7. Valores obtidos no teste de Shapiro-Wilk pra verificar a distribuição normal das curvas de adição de padrão em matriz.	89
Tabela 8. Valores obtidos no teste de Cochran pra verificar a homocedasticidade das curvas de adição de padrão em matriz.	90
Tabela 9. Valores de F para verificação do ajuste ao modelo linear para curva aquosa.	90
Tabela 10. Valores de inclinação da curva analítica média gerada através de regressão linear para a curva externa e para a curva de adição em matriz de leite bovino, caprino e extrato hidrossolúvel de soja.	91
Tabela 11. Valores obtidos no teste F para comparação das inclinações das curvas em solução padrão e por adição de padrão na matriz.	91
Tabela 12. Valores obtidos no teste de t -Student para os dados das curvas de adição de padrão em matriz.	92
Tabela 13. Valores de precisão intra e inter-ensaio para o método desenvolvido aplicado no capilar de sílica não revestido, avaliado em três níveis de concentração utilizando soluções padrão de nitrato, tiocianato e nitrito.	98

Tabela 14. Valores de recuperação de nitrato, tiocianato e nitrito avaliada em três níveis de concentração adicionados a três amostras com diferentes matrizes, utilizando capilares de sílica revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ) e não revestidos.	99
Tabela 15. Resultados da comparação entre ensaios realizados através do método desenvolvido por eletroforese capilar de zona proposto no presente trabalho e o método de referência da IN nº68/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para quantificação de nitrato e nitrito em amostras de extrato hidrossolúvel de soja.	101
Tabela 16. Valores obtidos no teste F para comparação do método por eletroforese capilar em zona proposto neste estudo e o método de referência da IN nº68/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para quantificação de nitrato e nitrito em amostras de extrato hidrossolúvel de soja.	101
Tabela 17. Valores obtidos no teste de t-Student para comparação do método por eletroforese capilar em zona proposto neste estudo e o método de referência da IN nº68/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para quantificação de nitrato e nitrito em amostras de extrato hidrossolúvel de soja.	102
Tabela 18. Comparação dos valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) obtidos através da relação sinal/ruído e dos parâmetros da curva analítica utilizando capilares não revestidos e revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).	102
Tabela 19. Resultados da quantificação de nitrato, tiocianato e nitrito para amostras de leite bovino, caprino e do extrato hidrossolúvel de soja pelo método proposto por eletroforese capilar de zona.	104
Tabela 20. Comparação de características analíticas do método proposto por CZE e outros métodos descritos na literatura empregados para análise de alimentos.	108
Tabela 21. Parâmetros da curva analítica para determinação de nitrito e nitrato por espectrofotometria de UV-Visível através do método de referência da IN nº68 de 12 de dezembro de 2006 do MAPA.	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC – Associação Oficial de Químicos Analíticos (do inglês, “*Association of Official Analytical Chemists*”)
- BGE - Eletrólito de corrida (do inglês, “*background electrolyte*”)
- CE - Eletroforese Capilar (do inglês “*Capillary Electrophoresis*”)
- CGE - Eletroforese capilar em gel (do inglês “*capillary gel electrophoresis*”)
- CIEF - Focalização isoeétrica capilar (do inglês “*capillary isoelectric focusing*”)
- CITP - Isotacoforese capilar (do inglês “*capillary isotachophoresis*”)
- CTGA - Cloreto de trimetil glicidil amônio
- CV - Coeficiente de Variação
- CZE - Eletroforese capilar de zona (do inglês “*capillary zone electrophoresis*”)
- DE - Diâmetro Externo do Capilar
- DI - Diâmetro Interno do Capilar
- EMD - Dispersão por Eletromigração (do inglês “*Electromigration Dispersion*”)
- EOF - Fluxo Eletro-osmótico (do inglês “*Electroosmotic flow*”)
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (do inglês “*Food and Agriculture Organization*”)
- GC - Cromatografia Gasosa (do inglês “*Gas Chromatography*”)
- HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”)
- IDA - Ingestão diária aceitável
- IN – Instrução normativa
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, “*International Union of Pure and Applied Chemistry*”)
- LD - Limite de Detecção
- LQ - Limite de Quantificação
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MEKC - Cromatografia eletrocinética micelar (do inglês “*micellar electrokinetic chromatography*”)
- MRC – Material de referência certificado
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- P.I. - Padrão Interno
- QTS - Quitosana

RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

SAQQ - Sal de Quitosana Quaternizada

LISTA DE SÍMBOLOS

- \rightarrow - Velocidade eletro-osmótica
 v_{eo}
- L_{ef} - Comprimento do capilar até o detector
- t_{eo} - Tempo de migração eletro-osmótica
- \rightarrow - Campo elétrico
 E
- \rightarrow - Mobilidade eletro-osmótica
 μ_{eo}

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO DA LITERATURA	31
2.1 O LEITE.....	31
2.2 O EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA.....	32
2.2.1 Nitrato e nitrito.....	32
2.2.2 Tiocianato.....	33
2.3 MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO NITRITO E TIOCIANATO	34
2.4 ELETROFORESE CAPILAR.....	35
2.4.1 Instrumentação básica da CE.....	37
2.4.2 O fluxo eletro-osmótico e sua atuação em CE.....	38
2.4.3 Uso de capilares revestidos em CE.....	41
2.5 PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA.....	46
2.6 NORMA TÉCNICA BRASILEIRA ISO 17025:2005	48
2.7 VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	48
2.7.1 Conformidade do sistema	48
2.7.2 Linearidade	49
2.7.3 Efeito de matriz	50
2.7.4 Seletividade	50
2.7.5 Precisão	51
2.7.6 Exatidão	52
2.7.7 Limites de detecção e quantificação.....	53
2.8 SOFTWARES	54
2.8.1 Desenvolvimento do método	54
3 OBJETIVOS	55
3.1 OBJETIVO GERAL	55
3.1.1 Objetivos Específicos.....	55
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	57

4.1 PROGRAMAS UTILIZADOS	57
4.2 REAGENTES E PADRÕES	57
4.3 INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES DO MÉTODO	57
4.4 COLUNAS CAPILARES	58
4.4.1 Condicionamento do capilar de sílica não revestido	59
4.4.2 Revestimento do capilar com SAQQ	59
4.4.3 Estabilidade do capilar revestido com SAQQ ao longo das corridas.....	59
4.4.4 Reconstrução do revestimento de SAQQ	60
4.5 COMPOSIÇÃO DO ELETRÓLITO DE CORRIDA	60
4.6 AMOSTRAS.....	61
4.6.1 Preparo de amostra.....	61
4.6.2 Ensaios de pré-concentração dos analitos	61
4.7 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	62
4.7.1 Conformidade do sistema	62
4.7.2 Linearidade.....	62
4.7.3 Efeito de matriz	63
4.7.4 Seletividade.....	63
4.7.5 Precisão	63
4.7.6 Exatidão	64
4.7.7 Limites de detecção e quantificação	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 COMPOSIÇÃO DO ELETRÓLITO DE CORRIDA	67
5.2 AMOSTRAS.....	75
5.2.1 Influência do solvente orgânico no preparo das amostras	75
5.2.2 Ensaios de pré-concentração dos analitos	76
5.3 ESTABILIDADE DO CAPILAR REVESTIDO AO LONGO DAS CORRIDAS.....	79
5.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	80
5.4.1 Conformidade do sistema	80

5.4.2 Linearidade	81
5.4.3 Efeito de matriz	85
5.4.4 Seletividade	92
5.4.5 Precisão	98
5.4.6 Exatidão	99
5.4.7 Limites de detecção e quantificação.....	102
5.5 DETERMINAÇÃO DE NITRATO, NITRITO E TIOCIANATO NAS AMOSTRAS DE LEITE E EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA.....	103
5.6 COMPARAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO PROPOSTO E OUTROS DESCRITOS NA LITERATURA.....	107
6 CONCLUSÃO	109
7 REFERÊNCIAS	111
ANEXO A	123
ANEXO B	125

1 INTRODUÇÃO

O leite é um produto consumido diariamente pela maioria das pessoas e por isso a demanda pelo produto é elevada. O mais consumido é o leite bovino, porém atualmente o consumo de leite caprino e outros produtos a base de soja vem aumentando devido à intolerância e/ou alergia desenvolvida em humanos a alguns compostos presentes no leite bovino. Todos estes produtos contêm uma composição complexa, incluindo gorduras, proteínas, açúcares, diversos íons, entre outros. Inúmeros compostos são analisados nestes produtos, entre eles os ânions nitrato, nitrito e tiocianato (SILVA, 1997; DRUNKLER, FARINA e NETO, 2010).

O nitrato pode ser convertido em nitrito e este pode ser transformado em compostos indutores do câncer (DUARTE e MIDIO, 1996; LIJNSKI, 1984). Além disto, altos níveis de nitrato prejudicam o transporte de oxigênio no sangue podendo levar a morte (BOER, 2003; JOHNSON et al., 1987; FAN, WILHITE, BOOK, 1987). O método oficial empregado para análise de nitrato e nitrito apresenta diversas desvantagens, como elevada demanda de materiais e reagentes conhecidamente tóxicos (DELLA BETTA, 2014).

O tiocianato é uma substância que pode estar naturalmente presente no organismo ou alimentação do animal e ser excretado no leite (WOLFSON e SUMNER, 1993). Porém pode ser adicionado para ativação do sistema lactoperoxidase, sendo este um fator antibacteriano natural simples e barato que atua prolongando a vida útil do leite em locais onde a refrigeração não está disponível (AUNE e THOMAS, 1978; SHAMILA-SYUNHADA et al., 2016; TRUJILLO, POZO e GUAMIS, 2007; SEIFU, et al., 2004). A legislação brasileira não veta a presença de tiocianato no leite, porém a ingestão excessiva pode produzir bócio ou deprimir a hiperatividade das glândulas tireóides interferindo no metabolismo do iodo. Além disto, não há um método oficial para análise deste ânion e desta forma seu controle não é realizado no leite (BRASIL, 2012; REITER, 1984).

Com o avanço da tecnologia novos métodos de análise empregando técnicas modernas podem ser desenvolvidos visando obter características mais vantajosas que os métodos convencionais, além de maior confiabilidade nos resultados e processos mais simples para utilização em laboratórios de rotina. As técnicas analíticas modernas empregam equipamentos que permitem alta sensibilidade, velocidade e elevada frequência analítica e se apresentam como uma alternativa aos métodos clássicos. Uma destas técnicas com potencial para

desenvolvimento de novos métodos é a eletroforese capilar (CE, do inglês, “*Capillary Electrophoresis*”) (TAVARES, 1996).

A CE é uma técnica de separação que apresenta inúmeras vantagens em sua aplicação, é possível destacar tempos de separação que duram segundos ou poucos minutos, alta eficiência de separação, baixo consumo de reagentes e amostra, análise simultânea das espécies em uma amostra, entre outros. Nesta técnica utilizam-se frequentemente capilares de sílica fundida, onde o fluxo é fortemente influenciado pelo pH do eletrólito, podendo influenciar substancialmente em uma separação afetando, por exemplo, o tempo de separação e com isso a precisão. Portanto, o controle do fluxo contribui para o bom desempenho analítico dos métodos. Para contornar isto é exigindo que os eletrólitos tenham uma boa capacidade tamponante. Porém, um eletrólito com boa capacidade tamponante não garante a estabilidade do fluxo, especialmente na região de pH próxima ao pK_a da sílica (4,0 – 6,0), onde pequenas variações de pH promovem alterações substanciais do fluxo. Além disso, a sílica do capilar pode interagir com certas substâncias presentes na matriz das amostras como, por exemplo, proteínas, as quais podem ser adsorvidas na superfície do capilar alterando as características do fluxo durante as separações. Nesse caso etapas adicionais de lavagem do capilar deveriam ser empregadas no método para remover estas substâncias, diminuindo a frequência analítica do método (TAVARES, 1996; VITALI, 2012; DELLA BETTA, 2014).

Dentre as alternativas que permitiriam contornar estes fatores que promovem variações do fluxo podem ser utilizados capilares de sílica revestidos. O uso de capilares revestidos visa adicionar uma camada normalmente polimérica na superfície de sílica do capilar a fim de alterar as propriedades químicas dessa superfície tornando o fluxo menos suscetível a variações de pH. Essa camada polimérica também pode atuar protegendo o capilar de interações indesejáveis com substâncias presentes na matriz das amostras. Um dos modos de revestimentos muito usado em CE são os revestimentos poliméricos, os quais apresentam as vantagens de facilidade de preparação por simples lavagem do capilar com diferentes soluções e a não necessidade de uso de aditivos no eletrólito de separação. Este procedimento de revestimento de capilares é possível com o uso de camadas poliméricas quimicamente ligadas o que contribui para a maior resistência do revestimento ao longo de várias separações. Para prevenir as variações do fluxo provocadas por substâncias indesejáveis presentes na matriz das amostras analisadas, uma alternativa seria o uso de reagentes

empregados no preparo das amostras que promovam a remoção dessas substâncias, por solubilidade, por exemplo. Para auxiliar o controle do EOF em métodos empregando CE o ideal é a combinação de um preparo de amostra visando remover possíveis interferentes e o uso de capilar revestido (VITALI, 2012).

A escolha das amostras de leite e do extrato hidrossolúvel de soja são justificadas pela importância como alimento consumido diariamente por humanos, pela presença de ânions de interesse em sua composição e pela complexidade da matriz que permitirá comparar o desempenho dos capilares não revestidos e revestidos com sal de quitosana quartenizada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O LEITE

Segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o leite é um produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2012).

O leite é um alimento natural valioso para todos os mamíferos, principalmente lactantes, crianças e animais em desenvolvimento, já que contém todos os princípios nutritivos. Sua composição é complexa podendo haver mais de cem mil constituintes distintos, embora a maioria deles ainda não tenha sido identificada (VEISSEYRE, 1998). A composição do leite apresenta variações ocasionadas por diversos fatores como: espécie, raça, fisiologia, alimentação dos animais, estações do ano, doenças, período de lactação, ordenhas, fraudes e adulterações (SILVA, 1997).

O leite bovino apresenta elevado valor nutritivo, como riqueza em proteínas, vitaminas, gorduras e sais minerais, cálcio, altos teores de tiamina, niacina e magnésio (GARCIA et al., 2000; PASCHOA, 1997). Contém ainda, elementos anticarcinogênicos presentes na gordura, como o ácido linoléico conjugado, esfingomielina, ácido butírico, β caroteno, vitaminas A e D (SANTOS e FONSECA, 2006). O leite é secretado pela glândula mamária como uma mistura desses e outros componentes e suas propriedades nutricionais são mais complexas que a soma dos seus componentes individuais (GONZÁLEZ et al., 2001).

O leite caprino também é considerado um alimento de alto valor nutritivo, porém apresenta algumas características físicas que o distinguem do leite bovino. Dentre estas, é possível citar o gosto típico, menor acidez natural e ainda o fato de não apresentar caroteno (pró-vitamina A), e sim vitamina A garantindo ao leite caprino uma coloração branca pura. Já no leite bovino a presença desta pró-vitamina é responsável por sua coloração mais amarelada (RIBEIRO e RIBEIRO, 2001). O teor de lactose é praticamente o mesmo em ambos os tipos de leites. O consumo do leite caprino é recomendável para pessoas com alergia à proteína lactoalbumina presente no leite bovino. Em 300 casos de asma em que a alergia a lactoalbumina do leite bovino foi diagnosticada como a principal causa, 270 tornaram-se livres dos

sintomas em seis semanas, após substituírem o leite bovino pela mesma quantidade de leite caprino (WALKER, 1991).

2.2 O EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA

O extrato hidrossolúvel de soja popularmente denominado "leite" de soja, é um produto conhecido desde a antiguidade pelos povos do Oriente. Seu consumo tem se popularizado por não ter lactose na sua constituição, deste modo apresenta-se como alternativa na alimentação de pessoas deficientes na produção da enzima lactase. (MORAIS e SILVA, 1996; CASÉ et al., 2005). Devido ao alto valor nutritivo e ao baixo custo de produção, pesquisadores e indústrias apresentam interesse crescente neste tipo de alimento. Além disto, o extrato hidrossolúvel de soja é normalmente aromatizado e suplementado com vitaminas, açúcar e minerais, melhorando, assim, o seu valor nutricional e sua aceitação no mercado. Sua composição química oscila muito em função da variedade da matéria-prima utilizada e do processamento empregado, entretanto, o produto acabado deve apresentar um teor proteico equivalente ao do leite bovino (MORETTI e HINOJOSA, 1981).

2.2.1 Nitrato e nitrito

Em decorrência do uso de fertilizantes na agricultura e dos dejetos de animais, nitrato e nitrito podem estar presentes naturalmente, nos alimentos de origem vegetal e animal e na água ou solo (LEVALLOIS e PHANEUF, 1994; RATH, XIMENES, REYES, 1994). Assim, nitrato e nitrito podem aparecer como contaminantes do leite e no extrato hidrossolúvel de soja, embora em concentrações pouco elevadas. O nitrato passa do solo para o pasto usado na alimentação bovina e, após a absorção pelos animais, são excretados pelo leite (SANTOS et al, 2005).

A utilização de produtos de limpeza a base nitrito dentro de fábricas de laticínios representa mais um risco de contaminação. Em setembro de 2012, houve vinte e sete casos de intoxicação de crianças e adultos por nitrito e nitrato após ingerir os produtos a base de leite de uma marca catarinense. Na época o responsável técnico da empresa afirmou que o resíduo no processo de limpeza de uma das tubulações da pasteurização do leite poderia ter sido a causa do problema (ROVAI, 2012; FARACO, 2012). A exposição contínua do homem a estes íons é

preocupante sob o ponto de vista toxicológico, pois no trato gastrointestinal, o nitrato pode ser convertido em nitrito pela ação de bactérias redutoras ou esta redução pode ocorrer no próprio alimento dependendo das condições que o mesmo se encontra e este pode ser transformado em compostos indutores do câncer (nitrosaminas) (DUARTE e MIDIO, 1996; LIJINSKI,1984). Altos níveis de nitrato nos alimentos ou na água bebida prejudicam o transporte de oxigênio no sangue, especialmente em crianças, devido à metemoglobinemia, que pode levar à anoxia e morte (BOER , 2003; JOHNSON et al., 1987; FAN, WILHITE, BOOK,1987). Também tem sido observado prejuízo na função da tireóide, decréscimo na alimentação e interferência no metabolismo das vitaminas A e E (BRUNING-FANN,1993).

A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece um limite máximo para a ingestão diária aceitável (IDA) de nitrato em $3,7\text{mg kg}^{-1}$ de peso corpóreo e de nitrito em $0,06\text{ mg kg}^{-1}$ de peso corpóreo (HORD et al, 2011). Portanto, para um adulto de 60 kg, a ingestão de nitrato não deve ultrapassar o valor de 222 mg dia^{-1} e a de nitrito $3,6\text{ mg dia}^{-1}$. Isto é preocupante, pois inúmeros alimentos consumidos diariamente podem apresentar teores de nitratos e nitritos, como vegetais, produtos cárneos, água e leite, exigindo um monitoramento contínuo.

2.2.2 Tiocianato

O tiocianato é uma substância que pode estar naturalmente presente nos órgãos (rins, estômago e etc.), fluidos (espinal, linfático, plasmático e etc.) e secreções (leite e saliva) dos mamíferos, sendo suas concentrações variáveis (WOLFSON e SUMNER, 1993). As concentrações de tiocianato em leite são reflexos das concentrações sanguíneas, as quais variam de acordo com a raça, regime de alimentação, saúde do úbere, fatores fisiológicos e tipos de alimentos (KUSSENDRAGER e HOOIJDONK, 2000).

Nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, o leite cru recebido nos centros de coleta é armazenado à temperatura de refrigeração e apenas quando foram recolhidas quantidades suficientes o leite é pasteurizado ou enviado para processamento. Isso pode levar dois a três dias. Contudo, na maioria desses países o resfriamento não está disponível nas zonas rurais. Além disto, o armazenamento à temperatura de refrigeração pode estender o prazo de validade do leite cru, mas a presença de contagens microbianas pode levar a deterioração. A ativação

do sistema lactoperoxidase no leite cru bovino é tida como um fator antibacteriano natural simples e barato e está relacionada com três componentes: a lactoperoxidase, a água oxigenada e o tiocianato. O peróxido de hidrogênio no leite, após ação da peroxidase, promove a oxidação do tiocianato em hipotiocianato que tem efeito antibacteriano, principalmente em bactérias Gram+, prolongando a vida útil e mantendo a qualidade do leite cru durante o transporte ou armazenamento especialmente em países tropicais e também quando as instalações de refrigeração não estão disponíveis. A relação ótima entre peróxido de hidrogênio e tiocianato foi estudada por diversos autores, constatando-se que a concentração de tiocianato pode chegar até 12 mg L^{-1} (AUNE e THOMAS, 1978; SHAMILA-SYUNHADA et al., 2016; TRUJILLO, POZO e GUAMIS, 2007; SEIFU, et al., 2004). Esta quantidade necessária para otimização do sistema pode estar presente naturalmente no leite cru ou ser adicionada, porém a concentração final é muito inferior à concentração existente na saliva e no suco gástrico dos seres humanos (WILSON e MATTHEUS, 1966).

A ingestão excessiva de tiocianato pode produzir bócio ou deprimir a hiperatividade das glândulas tireóides indiretamente, através de sua interferência no metabolismo do iodo (REITER, 1984). Doses de $4,8-6,4 \text{ mg L}^{-1}$ de tiocianato demonstraram ser competitivas, inibindo a absorção de iodeto pela glândula tireóide. (DOHAN, DE LA VIEJA e CARRASCO, 2000; FAO / OMS, 1990). A toxicidade ocorre frequentemente nas concentrações plasmáticas de tiocianato acima de 120 mg L^{-1} . Concentrações plasmáticas da ordem de 200 mg L^{-1} foram relatadas em mortes (FAO / OMS, 2005). Na China desde 2007, o tiocianato de sódio foi retirado como conservante alimentar no leite, considerando o seu potencial impacto tóxico e desde 2008 também está na lista negativa de substâncias não comestíveis eventualmente adicionadas em alimentos (YONG et al., 2017).

2.3 MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE NITRATO NITRITO E TIOCIANATO

A Instrução Normativa nº68/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) oficializa métodos físico-químicos de análise para controle de Leite e produtos lácteos. Nesta há um método normalizado para determinação que envolve a redução do nitrato a nitrito pela reação com cádmio esponjoso em meio alcalino, seguido da diazotização dos nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato

de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-ulfônico de coloração rósea que é determinado espectrofotometricamente a 540 nm. A determinação de nitrito é semelhante à determinação do nitrato, exceto pela etapa envolvendo a coluna de cádmio. Nestes métodos o preparo das amostras é laborioso e uma elevada quantidade de reagentes conhecidamente tóxicos e/ou corrosivos são utilizados, o que é um risco, tanto para o analista quanto para o meio ambiente, caso os resíduos gerados não sejam devidamente tratados (DELLA BETTA, 2014).

Nos últimos anos, diversas técnicas vêm sendo utilizadas na determinação de nitrato, nitrito e tiocianato, dentre os quais se destacam análises por espectrofotometria (AHMED et al., 1996; ANDRADE et al., 2003; RUIZ-CAPILLAS, ALLER-GUIOTE e JIMENEZ-COLMENERO, 2007; WOOLLARD e INDYK, 2014; SANTOS et al., 2005, MARTINS et. al., 2010), potenciometria (PÉREZ-OLMOS et al., 1997), voltametria (SANTOS et al., 2009), cromatografia iônica (MCMULLEN et al., 2005; HORD et al., 2011; YONG et al., 2017), eletroforese capilar (JASTRZEBSKA, 2010; MERUSI et al., 2010; DELLA BETTA et al., 2014; DELLA BETTA et. al., 2016; VITALI, FÁVERE e MICKE, 2011; BJERGEGAARD, MOLLER e SORENSEN, 1995).

Dentre as técnicas citadas a CE apresenta potencial para desenvolver métodos de separação simultânea de ânions em poucos minutos. Esta característica faz da CE uma técnica com potencial para ser desenvolvida como metodologia de análise rápida de ânions, como no caso nitrato, nitrito e tiocianato. Comparando com os demais métodos de separação como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*), a CE é considerada uma técnica analítica recente e vem ganhando cada vez mais atenção na comunidade científica.

2.4 ELETROFORESE CAPILAR

A palavra eletroforese é originada do grego *electro*, eletricidade; *phóresis*, transporte. Assim, a técnica de eletroforese é definida como uma técnica de separação baseada na diferença de migração de compostos iônicos ou ionizáveis na presença de um campo elétrico (SPUDEIT, DOLZAN e MICKE, 2012).

Historicamente, o químico sueco Arne Tiselius (1930) foi o pioneiro na utilização da eletroforese como ferramenta de separação, aplicando-a em proteínas presentes no sangue. Porém neste caso a eficiência de separação em solução livre foi limitada pelos fenômenos de difusão e convecção térmica resultantes do campo elétrico aplicado. Por isso, este tipo de eletroforese denominada eletroforese em placa, devido as dimensões dos tubos usados, teve que ser desenvolvida usando um meio anticonvectivo para tentar controlar os efeitos do aquecimento Joule assim como géis de poliacrilamida ou agarose. Ao longo dos anos, a eletroforese foi sendo aperfeiçoada de forma a se obter uma maior eficiência e diminuição dos efeitos térmicos provenientes da aplicação de um campo elétrico. Em 1967, Hjertén, descreveu um trabalho que iria contribuir para inserir definitivamente a eletroforese entre as técnicas de separações. Sua descoberta descreveu o desenvolvimento da separação eletroforética em um tubo estreito e aberto ou capilar, com alguns milímetros de diâmetro interno (LAUER e ROZING, 2009).

Em CE, a separação é conduzida nestes tubos de dimensões capilares, preenchidos com eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico. O uso do capilar oferece muitas vantagens sobre os outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel, papel, etc). Devido a fatores geométricos (a relação entre a área superficial interna e volume apreciavelmente grande), um capilar possibilita a dispersão eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (Efeito Joule). Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 1000 V/cm), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede 10^5 pratos teóricos), e tempos de análise apreciavelmente curtos (TAVARES, 1996). Externamente os capilares são revestidos com um polímero como poliimida, o teflon ou o polimetacrilato, por exemplo, o qual confere uma grande flexibilidade para o capilar permitindo seu manuseio. A superfície interna do capilar pode ser quimicamente modificada por meio de ligação covalente com diferentes substâncias. Estes recobrimentos são utilizados para uma grande variedade de propósitos, tais como, reduzir a adsorção da amostra ou mudar a carga iônica da parede do capilar (QUEIROZ e JARDIM, 2001).

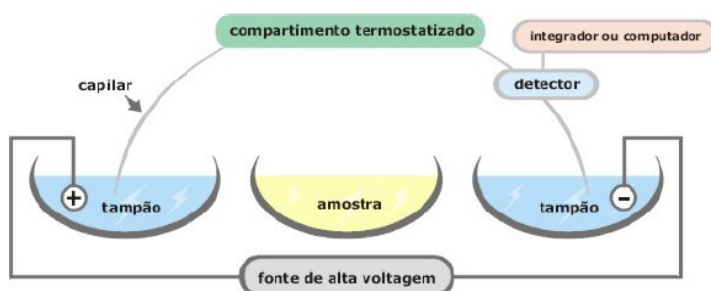
Existem vários modos de separação em CE com mecanismos singulares e seletividade característica, dos quais podemos destacar: eletroforese capilar de zona (CZE), eletroforese capilar em gel (CGE), focalização isoelétrica capilar (CIEF), cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), isotacoforese capilar (CITP). A CZE é um dos modos de separação mais empregados em CE e pode ser considerado um

exemplo do modo de fronteira móvel. Na Eletroforese Capilar de Zona (CZE) o capilar é preenchido com um eletrólito de corrida, a amostra é introduzida em uma das extremidades do capilar e um campo elétrico é aplicado. A separação ocorre porque os solutos migram com diferentes velocidades, características de sua mobilidade, a uma dada velocidade e direção determinadas pela sua massa e carga entre outras singularidades, e eventualmente passam pelo detector onde as informações são coletadas e armazenadas por um sistema de aquisição/análise de dados. É um modo amplamente usado para análises de íons inorgânicos, pequenas moléculas, peptídeos, proteínas e carboidratos (LAUER e ROZING, 2009; LANDERS, 2008).

2.4.1 Instrumentação básica da CE

A simplicidade na instrumentação necessária para promover a separação dos solutos é um dos pontos fortes da eletroforese capilar. A Figura 1 mostra uma representação esquemática de um sistema genérico de CE. O sistema é composto basicamente por uma fonte de alta tensão, capilar, eletrodos de platina, reservatórios de solução, detector e computador. A fonte de alta tensão geralmente pode ser operada à voltagem e/ou corrente constante, com voltagem podendo variar de -30 à +30 kV e corrente de 0 – 200 μ A (TAVARES, 1996).

Figura 1. Esquema representando a instrumentação básica de eletroforese capilar.



Fonte: QUEIROZ e JARDIM, 2001.

Nos tubos capilares utilizados uma pequena porção do recobrimento externo é removida a fim de se formar uma janela para a detecção. A janela é então alinhada ao centro óptico do detector do equipamento de CE. Os capilares são mantidos dentro de um

dispositivo, denominado cassete, que facilita a inserção no instrumento e protege a janela delicada de detecção. Os reservatórios de entrada e/ou saída do capilar podem conter eletrólito de corrida, amostra a ser injetada ou outras soluções pertinentes ao método de separação proposto. Além disso, estes reservatórios podem ser facilmente trocados.

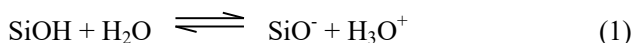
A escolha do detector para uma análise em particular por eletroforese capilar deve levar em consideração alguns critérios como: sensibilidade, seletividade, faixa linear de concentração e ruído. A resposta do detector deve produzir uma relação conhecida e reprodutível com a quantidade ou concentração do soluto, e também fornecer um amplo intervalo linear de sinal gerado em função da concentração do soluto. O sinal gerado pelo detector deve ser independente do tipo de solução empregada e não deve contribuir para o alargamento das bandas. Os detectores comumente usados em eletroforese capilar podem ser classificados como universais e específicos. Os universais medem a diferença entre alguma propriedade do soluto em relação à solução. Nesta classe estão incluídos os detectores de índice de refração e condutividade. Os detectores específicos, por outro lado, medem uma propriedade específica do soluto. Nesse grupo estão incluídos os fotodetectores (baseados na absorção na região do UV/Visível, na fluorescência, ou no espalhamento Raman), os espectrômetros de massas, os detectores amperométricos e radiométricos. Os detectores específicos apresentam diferentes vantagens em relação aos universais e dentre elas pode-se destacar: maior sensibilidade, maior intervalo linear de resposta e melhor relação sinal/ruído (TAVARES, 1996). O sistema de detecção mais simples e usado em CE é de absorção na região do UV/Visível. Suas vantagens incluem baixo custo de aquisição e manutenção, além de uma ampla gama de moléculas que podem ser facilmente detectadas.

O computador tem a função de permitir a seleção e o controle dos parâmetros do sistema, além da aquisição e tratamento de dados da análise por meio de um software específico. Outra parte importante é o sistema de controle da temperatura do capilar que tem por finalidade minimizar efeitos do aquecimento Joule. Os modos de termostatização empregados são por meio da circulação de um líquido ou ar através de um suporte de fixação do capilar (TAVARES, 1996).

2.4.2 O fluxo eletro-osmótico e sua atuação em CE

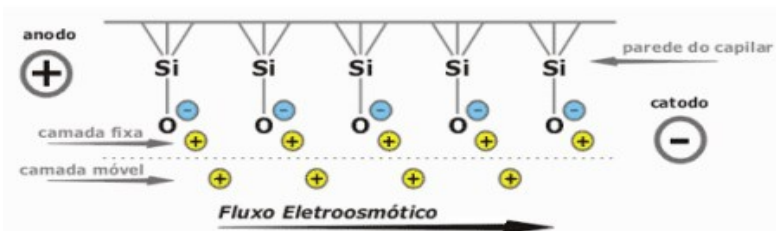
Um fenômeno importante que está sempre presente nas separações, em maior ou menor magnitude é chamado de fluxo eletro-

osmótico (EOF). O EOF pode desempenhar um papel muito importante nas análises por CE quando não for negligenciável, sendo responsável por gerar o movimento da solução do interior do capilar como um todo, afetando a velocidade de migração das espécies ionizadas sem distinção de cargas. O EOF é influenciado por uma série de fatores, dentre eles a característica da superfície do capilar em que as separações são realizadas. A parede do capilar de sílica fundida não revestido (Figura 2), contém grupos silanóis (SiOH) que conferem a este material um caráter de ácido fraco ($pK_a \sim 4-6$) (LANDERS, 2008). Quando o capilar de sílica é colocado em contato com meio aquoso onde ocorre a deprotonação de alguns desses grupos, é gerada uma superfície com carga negativa, conforme Equação (1):



Dependendo do pH da solução aquosa existirá uma menor ou maior quantidade de carga na superfície interna do capilar. Uma camada de contra-íons hidratados (cátions) é então formada próxima à parede do capilar a fim de manter a eletroneutralidade, originando uma dupla camada elétrica (SOARES, 2007). Nessa última camada os contra-íons hidratados acumulam-se na superfície do capilar, pois estão fortemente atraídos pelos silanóis ionizados formando uma camada fixa (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática da migração de espécies carregadas positivamente em direção ao cátodo em um capilar de sílica fundida.



Fonte: QUEIROZ e JARDIM, 2001.

A concentração de contra-íons na superfície do capilar é elevada, mas decresce à medida que se afasta da superfície do capilar em direção ao centro da solução até que esses contra-íons não sofrem mais atração das cargas negativas, formando uma camada móvel. Sobre ação de um campo elétrico as espécies iônicas hidratadas se movem em direção ao eletrodo de carga oposta devido à atuação das forças elétricas sobre os íons e esse movimento dos íons conduz a solução dentro do capilar

como um todo caracterizando o EOF catódico (TAVARES, 1996). No caso da superfície do capilar apresentar cargas positivas originadas, por exemplo, por uma modificação química da superfície do capilar, os contra-íons seriam negativos e o EOF seria anódico.

A magnitude do EOF em um capilar pode ser expressa em termos da mobilidade eletro-osmótica, a qual é calculada considerando-se as seguintes Equações:

$$\vec{\mu}_{eo} = \frac{\vec{v}_{eo}}{E} \quad (2)$$

$$\vec{v}_{eo} = \frac{L_{ef}}{t_{eo}} \vec{E} \quad (3)$$

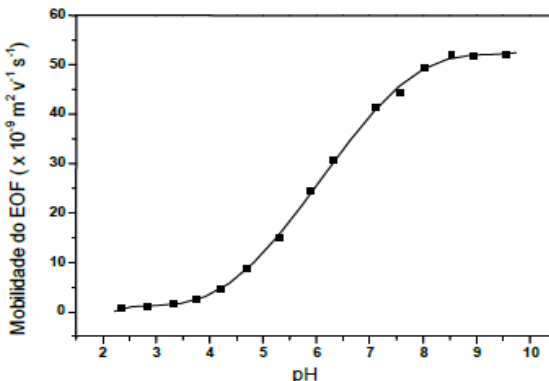
substituindo a Equação (3) na Equação (2) tem-se que:

$$\vec{\mu}_{eo} = \frac{L_{ef}}{t_{eo}} \vec{E} \quad (4)$$

onde, \vec{v}_{eo} é a velocidade eletro-osmótica em $m s^{-1}$; L_{ef} é o comprimento do capilar até o detector em m ; t_{eo} é o tempo de migração eletro-osmótica em s ; \vec{E} é o campo elétrico aplicado em $v m^{-1}$; e $\vec{\mu}_{eo}$ é a mobilidade eletro-osmótica em $m^2 v^{-1} s^{-1}$ (LAUER, 2009).

Em um capilar de sílica fundida pode-se observar que a magnitude do EOF é altamente dependente do pH do eletrólito, uma vez que este afeta a ionização dos grupos silanóis na parede do capilar e por sua vez afeta o EOF. Na Figura 3 está apresentado o perfil de variação do EOF em diferentes pH para um capilar de sílica.

Figura 3. Variação do fluxo eletro-osmótico com o pH em um capilar de sílica fundida.



Fonte: VITALI, 2012.

O EOF pode ser influenciado pelas características da superfície do capilar utilizado na separação. Neste sentido, a utilização de capilares modificados surge como alternativa para alteração da magnitude do EOF. As modificações das paredes dos capilares podem ser classificadas como: uso de pequenas moléculas como aditivos na solução de separação; revestimento polimérico covalentemente ligado a sílica; e revestimento usando polímero adsorvido fisicamente na sílica. A modificação das paredes do capilar utilizando pequenas moléculas como aditivos, assim como pequenas aminas e surfactantes, minimiza a adsorção de proteínas nos capilares, sendo empregada em diferentes aplicações. Porém, o uso de aditivos na solução de separação, além de modificar as paredes do capilar, pode interferir nas propriedades de alguns analitos consistindo em um problema para a análise. Outra limitação pode ser o tempo de equilíbrio necessário a fim de se obter uma superfície reprodutível e com EOF estável. O segundo tipo de modificação compreende polímeros ou pequenas moléculas ligados covalentemente a algum dos grupos funcionais da sílica. Essas modificações resultam na redução da adsorção de proteínas no capilar e modificação do EOF. Entretanto, muitas dessas modificações envolvem reações lentas que ocorrem em várias etapas, necessidade de condições especiais como alta temperatura, uso de solventes tóxicos e, além disso, os procedimentos não são muito reprodutíveis (VITALI, 2012; DOHERTY et al, 2003; LUCY; MACDONALD; GULCEV, 2008).

A modificação do capilar baseada na adsorção física de polímeros nas paredes dos capilares traz algumas vantagens em relação às demais maneiras de modificação do EOF e prevenção da adsorção de proteínas, como a simplicidade na formação do revestimento, possibilidade de regeneração do revestimento, conhecimento prévio das propriedades dos polímeros o que permite um planejamento da modificação (VITALI, 2012).

2.4.3 Uso de capilares revestidos em CE

Os capilares de sílica fundida não revestidos comumente empregados em CE têm algumas características que podem ser alteradas a fim de promover melhorias nos métodos de separação. Uma delas é obter outros tipos de perfis EOF em função do pH de acordo com interesse de melhoramento de métodos de separação, como por exemplo, capilares com EOF anódico para separações rápidas de ânions. Outra característica que poderia ser melhorada é a reprodutibilidade dos

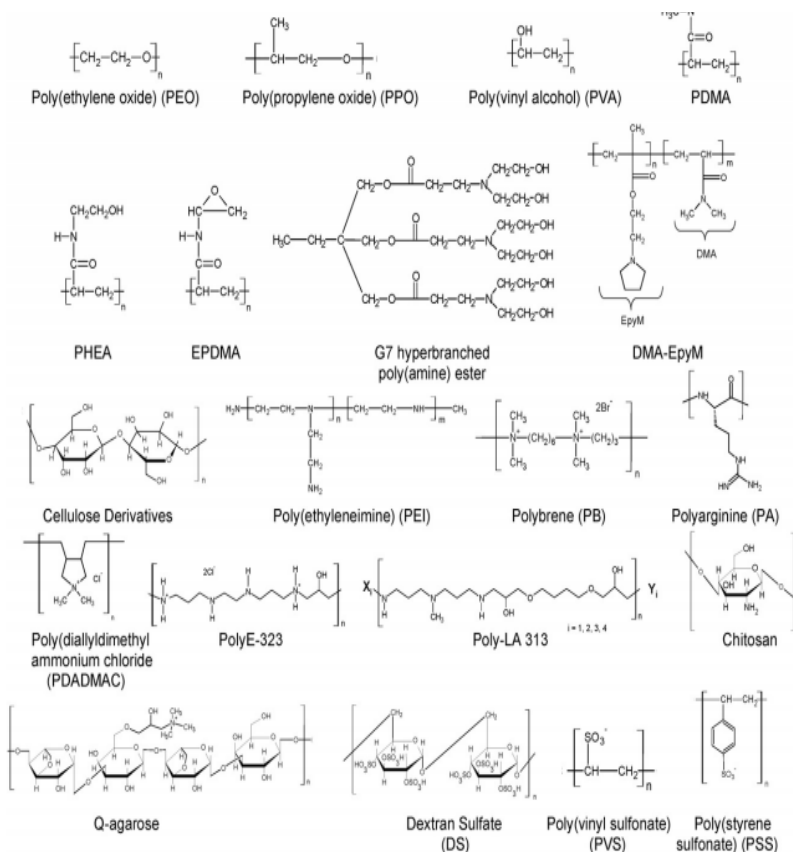
métodos através de EOF mais estáveis e capilares que tivessem o mínimo de interações indesejáveis com substâncias presentes na matriz das amostras, as quais podem alterar o EOF durante as separações prejudicando as precisões dos métodos. Muitas pesquisas têm sido realizadas com o propósito de minimizar as interações indesejáveis entre substâncias presentes em amostras e a superfície do capilar de sílica, incluindo o uso de condições de pH extremos, tampões com elevada força iônica e modificações da superfície das paredes dos capilares de sílica (SHAH, 2002).

A vantagem do uso de capilares revestidos em relação aos outros modos de minimizar interações indesejáveis de moléculas da amostra com a sílica é a simplicidade de preparo dessas modificações. Outra vantagem destas colunas revestidas é a boa condutividade térmica, o que facilita a dissipação do calor gerado pela aplicação de tensão no capilar prevenindo o efeito Joule, que pode prejudicar as separações. Além disso, os capilares revestidos apresentam transparência para a região do UV-visível, permitindo seu uso com detectores de UV comumente empregados em CE. Essas características importantes são alcançadas com o uso de modificadores adequados (CIFUENTES et al., 1998).

O uso de capilar modificado para separações por CE em amostras com matrizes complexas pode atuar prevenindo, por exemplo, a adsorção de proteínas nas paredes do capilar de sílica, o que contribui para a qualidade das análises dessas substâncias e também minimiza variações do EOF entre as corridas. Um EOF controlado empregando capilar modificado permite análises de outras substâncias em amostras que contenham proteínas, minimizando a necessidade de procedimentos para remoção dessas proteínas do capilar entre corridas. Isso proporciona a vantagem de realizar análises com procedimentos mais rápidos, e também pode contribuir para uma boa reprodutibilidade no tempo de migração dos solutos.

A utilização de capilares modificados pode ser explorada de muitas maneiras, dentre elas usando revestimentos poliméricos (Figura 4). Diversos tipos de polímeros aniônicos, catiônicos e neutros podem ser empregados em revestimentos de capilares de sílica. Os capilares podem ser revestidos dinamicamente através da simples adição de polímeros solúveis em água ao eletrólito de corrida (BGE, do inglês “Background Electrolyte”), durante a separação. Porém em geral, uma maior eficiência é alcançada usando adsorção estática destes revestimentos poliméricos (LUCY, MACDONALD e GULCEV, 2008).

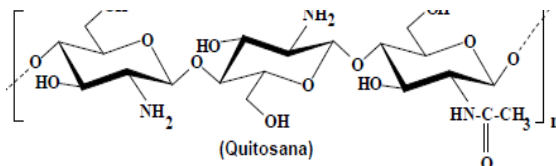
Figura 4. Estruturas de polímeros utilizados para a preparação de revestimentos fisicamente adsorvidos.



Fonte: LUCY, MACDONALD e GULCEV, 2008.

A quitosana (QTS, Figura 5), obtida da reação de desacetilação da quitina o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. É um biopolímero que vem sendo estudado como modificador de capilares de sílica fundida (FU *et al.*, 2007; HUANG e WANG, 2006).

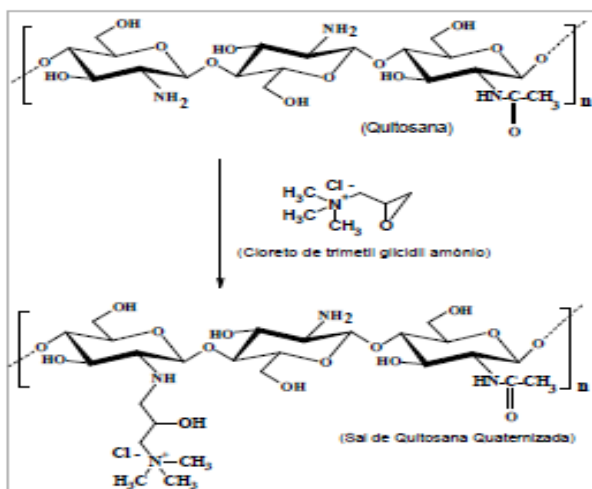
Figura 5. Estrutura do biopolímero quitosana.



Fonte: Adaptado de VITALI, 2012.

A presença de grupos amino primários na cadeia polimérica possibilita que o biopolímero QTS reaja com o cloreto de trimetil glicidil amônio (CTGA) formando o sal de quitosana quaternizada ou simplesmente quitosana quaternizada (SAQQ), conforme Figura 6.

Figura 6. Representação da equação química para a obtenção do sal de quitosana quaternizada a partir da quitosana e do cloreto de trimetil glicidil amônio.



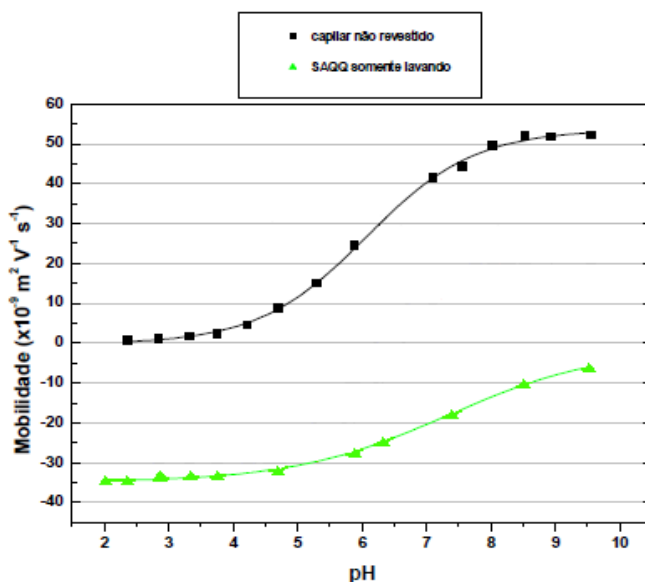
Fonte: VITALI, 2012.

O SAQQ foi desenvolvido e utilizado como modificador de capilar para aplicação em CE por Ma e colaboradores (MA *et al.*, 2007),

pois apresenta uma alta densidade de carga positiva propiciando a interação por ligação iônica com superfícies carregadas negativamente como, por exemplo, a sílica, componente básico dos capilares usados em separações por CE.

A modificação dos capilares de sílica com polieletrólitos catiônicos como a SAQQ resulta em uma inversão do EOF. Essa inversão é originada pela modificação das características químicas da parede (a adsorção do polímero introduz novos grupos funcionais na parede que vão influenciar na densidade de cargas da superfície do capilar) o que altera o potencial zeta, e também modifica o EOF. Com o EOF invertido, ânions passam a migrar no mesmo sentido do EOF e cátions em sentido contrário (VITALI, 2012). Essas mudanças trazem vantagens para as separações de ânions, dentre elas, diminui o tempo de análise e contribui para melhorar a resolução de separação entre espécies no modo contra eletro-osmótico. Utilizando o SAQQ como modificador do capilar um perfil diferente de EOF é obtido quando comparado ao perfil do EOF obtido utilizando um capilar de sílica sem revestimento, conforme pode ser observado na Figura 7.

Figura 7. Curvas de mobilidade do fluxo eletro-osmótico em função do pH, para capilares de sílica fundida não revestido e revestido com o sal de quitosana quaternizada (SAQQ).



Fonte: Adaptado de VITALI, 2012.

Segundo VITALI (2012) na modificação com SAQQ o comportamento observado para o EOF em função do pH foi um valor de mobilidade praticamente constante e anódico de pH 2,0 a 4,7; e a partir deste pH até pH 9,5 observou-se uma diminuição linear da intensidade do EOF com o aumento do pH, mas ainda assim mantendo-se anódico. O EOF anódico em toda a faixa de pH é justificado pela presença de grupos amino quaternário que estão carregados independentemente do pH do meio. O EOF anódico mais intenso obtido em baixo pH é devido ao pKa (cerca de 6) do SAQQ que garante que os grupos amino estejam protonados aumentando a densidade de cargas. Em pH acima de 5, começa a ocorrer a deprotonação dos grupos amino e dos grupos silanóis remanescentes (que não interagiram com SAQQ) provocando uma diminuição das cargas positivas na parede do capilar, o que consequentemente diminui o EOF, porém ele se mantém anódico em pH alcalino devido a presença de grupos amino quaternários do SAQQ.

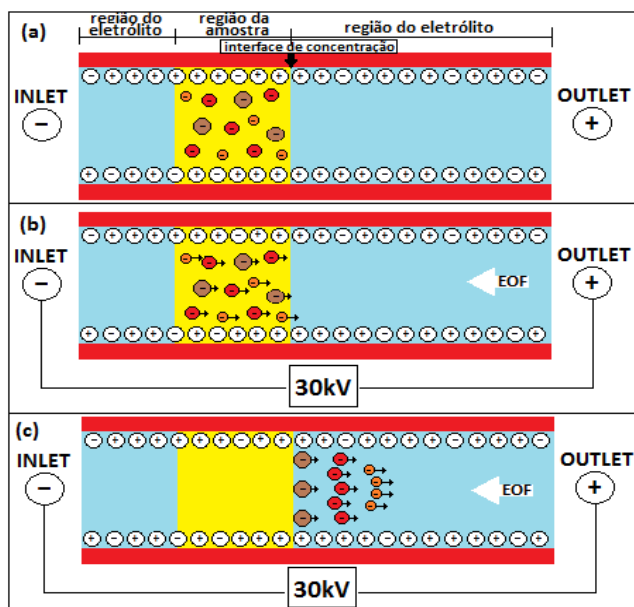
A estabilidade química do revestimento com o SAQQ foi investigada por VITALI (2012) utilizando diferentes soluções e solventes, como ácido clorídrico; hidróxido de sódio; ácido acético todos a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; acetonitrila e etanol e solução de ureia 5 mol L^{-1} . O EOF foi medido antes e após 100 volumes de lavagem do capilar revestido com solução teste e a estabilidade química foi avaliada em termos de razão de alteração do EOF. A razão de alteração obtida para o revestimento empregando todas as soluções testes variaram de -5,4 a 2,9%. A presença dos grupos amino quaternário na cadeia do SAQQ conferem uma densidade de carga positiva constante que podem ter auxiliado a fixação do polímero na superfície do capilar independentemente do pH do meio.

2.5 PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA

A pré-concentração de analitos carregados de uma amostra é provocada pelo movimento desses íons através de uma região limite que é formada entre a zona da amostra e a zona de separação dentro do capilar (PYELL, 2006; SIMPSON; QUIRINO; TERABE, 2008). A zona da amostra possui uma condutividade elétrica menor que a zona do eletrólito. Ao injetar um longo plugue de amostra no capilar, durante a aplicação de tensão, a baixa condutividade da zona da amostra sofre ação de um alto campo elétrico. Já na região do eletrólito há uma alta condutividade e baixo campo elétrico. Assim, a velocidade eletroforética dos íons do analito na zona da amostra é então maior que na zona do

eletrólito, pois a velocidade eletroforética é definida como produto da mobilidade eletroforética efetiva do analito e a força do campo elétrico. Esta mudança repentina na velocidade dos íons dos analitos da região da zona da amostra para a zona do eletrólito resulta no estreitamento da zona de migração do analito, e conseqüentemente, em um empilhamento destes íons. Esta técnica tem como finalidade realizar uma concentração dos íons da amostra, pois injetando maiores volumes, sem perda de resolução dos picos, obtêm-se ganho em sinal do analito o que indica uma pré-concentração da amostra. O efeito de concentração obtido é dependente da razão entre a força do campo elétrico na zona da amostra e na zona do eletrólito (PYELL, 2006; SIMPSON; QUIRINO; TERABE, 2008). A Figura 8 apresenta um esquema que demonstra o efeito de pré-concentração descrito no interior do capilar de sílica não revestido para ânions.

Figura 8. (a) Representa as regiões do eletrólito e da amostra no capilar as quais durante a aplicação de tensão tem diferentes campos elétricos; (b) migração dos íons na região da amostra imediatamente após a aplicação de tensão, e (c) migração dos íons na região do eletrólito.



Fonte: Próprio autor.

2.6 NORMA TÉCNICA BRASILEIRA ISO 17025:2005

A norma técnica brasileira ISO 17025:2005, diz respeito aos requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração e é aplicável a todos os laboratórios independente do número de pessoas ou da extensão do escopo. Nesta consta que o laboratório deve utilizar métodos de ensaio e/ou calibração que atendam as necessidades do cliente e que sejam apropriados para os ensaios que realiza, utilizando de preferência métodos atualizados e publicados em normas internacionais, regionais ou nacionais. Quando o cliente não especificar o método a ser utilizado, o laboratório deve selecionar o método adequado que tenha sido publicado em normas por organizações técnicas respeitáveis, ou métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório, se forem apropriados para o uso e se estiverem validados (ABNT, 2005).

2.7 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

O desenvolvimento de um método analítico, adaptação ou implementação de um método, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo é denominado de validação e os termos envolvidos são chamados de figuras de mérito do método (ABNT, 2005; BRITO et. al., 2003). A validação de determinado procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados (BRASIL, 2011). Existem vários protocolos de validação de métodos analíticos entre eles o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC). Parâmetros analíticos importantes que devem ser avaliados no método incluem conformidade do sistema, faixa de trabalho; linearidade; efeito de matriz; seletividade, precisão e limites de detecção e quantificação.

2.7.1 Conformidade do sistema

Testes de conformidade do sistema são realizados antes de realizar experimentos de validação ou mesmo análises de amostras. Esta avaliação pode ser definida como um conjunto de testes para garantir

que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis (RIBANI et.al., 2004). Alguns protocolos de validação não contemplam este parâmetro, no entanto julga-se importante garantir que o sistema de análise fornecerá dados confiáveis. Os parâmetros avaliados podem ser fator de retenção (k); repetitividade (CV); resolução (Rs); fator de alargamento (TF); número de pratos da coluna (N). Segundo Ribani et.al. (2004), no mínimo dois destes critérios são requeridos para garantir a conformidade do sistema.

2.7.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A correlação entre o sinal medido (área do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada é uma relação matemática, muitas vezes, expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (RIBANI, 2004). Para Thompson, Ellison e Wood (2002) as curvas analíticas devem ser construídas em triplicata, possuir seis ou mais pontos distribuídos de forma equidistante, com concentrações menores e maiores que o valor esperado. A partir dos pontos experimentais pode ser calculado, utilizando regressão linear, o coeficiente de correlação (r) e de determinação (R^2). Estes parâmetros permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI, 2004). Porém estes coeficientes por si só não são suficientes para garantir o ajuste da curva ao modelo linear, pois modelos com alto resíduo ou pontos mal distribuídos também podem fornecer bons coeficientes de correlação e determinação (RIBEIRO et al., 2008; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

A qualidade da curva de calibração e de sua linearidade será avaliada através da inspeção visual do gráfico da reta de calibração e do gráfico de resíduos gerados pela regressão linear. O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) é uma das ferramentas estatísticas mais aceitas para avaliar a linearidade. Os pontos experimentais deverão estar próximos e aleatoriamente distribuídos ao redor da reta ajustada. Os pontos no gráfico dos resíduos deverão estar aleatoriamente distribuídos ao redor do eixo x, ter variância constante (homoscedasticidade), não apresentando nenhum comportamento

regular ou tendência funcional e ausência de valores discrepantes (BRASIL, 2011; BUSSAB e MORETTIN, 2010).

2.7.3 Efeito de matriz

A matriz pode conter diversos componentes que interferem no desempenho da medição e estes interferentes podem agir aumentando ou reduzindo o sinal analítico⁴⁵. Para avaliação do efeito de matriz em amostras desconhecidas, complexas, e na ausência de amostras brancas, o método mais indicado é a adição de padrão (HARRIS, 2008). O método de adição padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. Estas amostras com o padrão incorporado são utilizadas para a obtenção dos eletroferogramas. Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância que está sendo determinada, sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração da substância na amostra analisada (RIBANI et.al., 2004).

A curva de calibração em matriz será conduzida de forma semelhante ao procedimento para construção em solução padrão, respeitando as mesmas concentrações, diluições e na mesma faixa de trabalho. A curva de calibração em matriz será avaliada quanto ao parâmetro linearidade, e caso este seja confirmado, faz-se a comparação entre as inclinações das curvas em solução padrão e em curva de matriz a fim de comparar se existe diferença significativa entre si, caso isso não se comprove, pode-se dizer que a matriz não afeta o ensaio (TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

2.7.4 Seletividade

Um método é chamado seletivo quando produz respostas para vários analitos, mas pode distinguir a resposta de um analito da de outros em uma amostra (INMETRO, 2003). A seletividade avalia o grau de interferência de espécies com um ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes na

amostra. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et.al., 2004).

2.7.5 Precisão

O parâmetro precisão se refere a uma estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A precisão é expressa por meio do coeficiente de variação (CV) e pode ser demonstrada de três maneiras, por meio da repetitividade, da precisão intermediária (ou reprodutibilidade interna ou intralaboratorial) e da reprodutibilidade (BRASIL, 2011). Os parâmetros de medida do CV dependem da técnica empregada, para CE, por exemplo, recomendam-se os parâmetros tempo de migração e área do pico (DELLA BETTA, 2014).

A repetitividade também denominada precisão intraensaio ou intra-corrída representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método para uma mesma amostra em diferentes preparações, sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo. O termo repetitividade é utilizado pelo INMETRO, por outro lado a ANVISA utiliza repetibilidade, mas ambos apresentam o mesmo conceito. A precisão intermediária tem como objetivo verificar se no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. Neste sentido a precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. Para a repetitividade quanto para a precisão intermediária, o INMETRO (2003) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do CV, enquanto a ANVISA (2003) sugere um mínimo de nove determinações (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado. A precisão instrumental também pode ser avaliada através do CV obtido para injeções repetitivas, seqüenciais da mesma amostra (tipicamente 10 ou mais vezes) (RIBANI et.al., 2004; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

A reprodutibilidade refere-se aos resultados obtidos para uma mesma amostra, seguindo a mesma metodologia, mas efetuadas sob condições variadas (mudança de operadores, local, instrumentos, entre

outros fatores experimentais). A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) não aconselha tirar conclusões com menos de cinco laboratórios e recomenda oito laboratórios (RIBANI et.al., 2004; THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

2.7.6 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003). Os quatro métodos principais para avaliação da exatidão, são baseados no uso de material de referência certificado, na comparação do método proposto com um método de referência, no uso de ensaios de recuperação na matriz e em estudos colaborativos interlaboratoriais (GONZÁLEZ, HERRADOR e ASUERO, 1999).

A utilização de material de referência certificado (MRC) quando disponíveis são os materiais de controle ideais, pois estão diretamente relacionados com padrões internacionais. Entretanto, o alto custo do MRC e a abrangência limitada de matrizes e analitos restringem seu uso (WESLEY, POCKLINGTON, WALKER, 1991). A exatidão também pode ser estabelecida mediante comparação entre os valores obtidos pelo método proposto com os valores obtidos para as mesmas amostras com outro método validado (método com precisão e exatidão avaliadas). Entretanto, nem sempre se encontra um método de referência preexistente, impossibilitando a utilização desse tipo de proposta (GONZÁLEZ, HERRADOR e ASUERO, 1999). Estudos colaborativos implicam na aceitação de pelo menos oito laboratórios para desenvolver determinado método, podendo reduzir para um mínimo absoluto de cinco laboratórios participantes. Porém a maior dificuldade está em assegurar que a concentração do analito a ser determinada na amostra, permaneça estável durante o decorrer do estudo (WESLEY, POCKLINGTON, WALKER, 1991).

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para avaliação da exatidão do ensaio. O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra e posteriormente determinação da concentração do analito adicionado. Porém esta forma de recuperação apresenta limitações uma vez que o analito adicionado, não está na amostra da mesma forma, e sim de uma forma mais facilmente detectável. A recuperação é expressa em percentual e está diretamente relacionada aos processos de perda devido à baixa recuperação da

extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra, entre outros fatores (INMETRO, 2003; GONZÁLEZ, HERRADOR e ASUERO, 1999; BRITO et. al., 2003).

2.7.7 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental. O LD e o LQ podem ser calculados de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et.al, 2004).

O método mais utilizado é o da relação sinal-ruído para técnicas analíticas em geral. A determinação da razão sinal/ruído é realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado ou quantificado. Para o limite de detecção um sinal três vezes maior que a razão sinal/ruído do equipamento é considerado aceitável, mas é ainda muito pequeno para ser uma medida exata. Já para o limite de quantificação considera-se aceitável um sinal 10 vezes maior que a razão sinal/ruído do equipamento, pois a concentração do analito pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão (DELLA BETTA, 2014; BRITO et. al., 2003).

Para as técnicas analíticas de separação, como as eletroforéticas, a medição do ruído pode não ser trivial e às vezes até subjetiva (já que a curva analítica é construída com a área e não somente o sinal do detector). Além disso, tanto o LD quanto o LQ podem ser afetados pelas condições cromatográficas (picos maiores aumentam a relação sinal-ruído, resultando em LD e LQ mais baixos). O melhor caminho para resolver este problema do cálculo do LD e LQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável (RIBANI et.al., 2004).

2.8 SOFTWARES

2.8.1 Desenvolvimento do método

O *PeakMaster*[®] é um software livre desenvolvido por Gas e colaboradores em 2001, com a finalidade de realizar simulações de análises e desenvolvimento de métodos por CZE. O software está disponível gratuitamente na versão 5.3 (HRUSKA, JAROS e GAS, 2006; GAS et. al., 2001; STEDRY, JAROS e GAS, 2002). O *PeakMaster*[®] utiliza uma série de equações derivadas da teoria para calcular a migração dos analitos em função de determinados parâmetros de entrada. Esses parâmetros de entrada envolvem concentração dos componentes do eletrólito de corrida, pKa e mobilidade iônica de todas as espécies envolvidas na separação. Valores tabelados para uma gama de compostos (~ 400) foram incluídos e podem ser selecionados dentro do programa. Além disso, o usuário pode especificar uma variedade de outros parâmetros, tais como o comprimento capilar (total e efetivo), tensão aplicada, polaridade, presença e mobilidade do fluxo e o tipo de detecção pode ser escolhida entre condutividade, detecção direta ou detecção indireta (JOHNS, 2009). Na saída do programa é exibido um eletroferograma simulado, juntamente com os dados tabelados, incluindo a mobilidade efetiva e tempos de migração para cada analito. Devido a estas características o programa torna-se uma ferramenta útil e vantajosa para seleção dos parâmetros de um método por CZE, reduzindo a geração de resíduos e otimizando o processo de desenvolvimento do método.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método por CZE para a separação de nitrato, nitrito e tiocianato a partir de amostras de leite bovino, caprino e extrato hidrossolúvel de soja, comparando o desempenho do método com o emprego de capilares de sílica não revestidos e revestidos com SAQQ.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Utilizar o *software PeakMaster®* como ferramenta para selecionar as condições ideais de análise, bem como a escolha adequada das concentrações dos componentes do eletrólito de corrida e selecionar um padrão interno adequado para o método;
- Aplicar o método de separação desenvolvido por CZE em capilares de sílica não revestido e revestido com SAQQ;
- Avaliar a durabilidade da capacidade tamponante do eletrólito ao longo de corridas consecutivas;
- Verificar o potencial de pré-concentração dos analitos por *stacking* injetando diferentes volumes de amostra de leite em capilares de sílica revestidos e não revestidos com SAQQ;
- Avaliar a estabilidade do revestimento de SAQQ no capilar de sílica ao longo das corridas;
- Realizar a validação analítica do método aplicado aos diferentes capilares, verificando sua adequação quanto aos parâmetros analíticos: conformidade do sistema, linearidade, efeito de matriz, seletividade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação;
- Aplicar o método desenvolvido e selecionado em amostras de leite e extrato hidrossolúvel de soja;
- Comparar características do método desenvolvido com outros métodos descritos na literatura, incluindo o tempo de análise, consumo de reagentes, limite de detecção, entre outros.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PROGRAMAS UTILIZADOS

O software *PeakMaster*[®] versão 5.3 foi utilizado como ferramenta auxiliar no desenvolvimento do método de separação. A análise estatística foi realizada com nível de significância de 5%, utilizando os softwares *Statistica*[®] 13.0 e *Assistat*[®] 7.7. O tratamento dos dados foi conduzido empregando os softwares *Origin*[®] 8.0 e *Microsoft Excel*[®] 2010.

4.2 REAGENTES E PADRÕES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Para preparo das soluções foi utilizada água desionizada em sistema Milli-Q (*Millipore*[®], Bedford, MA, USA), com resistividade de 18,2 M Ω cm a 25 °C. Os padrões de nitrato de potássio (KNO₃), tiocianato de sódio (NaSCN), nitrito de sódio (NaNO₂) e bromato de sódio (NaBrO₃) foram obtidos da *Synth* (São Paulo, São Paulo, Brasil), preparados individualmente em água desionizada com concentração final aproximada de 100 mg L⁻¹ e armazenados sob refrigeração. Utilizou-se acetonitrila grau HPLC (Tédia, Brazil). Ácido aminocapróico (*Sigma Aldrich*[®], Brazil) e ácido perclórico (*Synth*[®], São Paulo, Brasil) foram utilizados para o preparo do eletrólito de corrida. Para revestimento dos capilares foi utilizada uma solução de sal de quitosana quaternizada (SAQQ) 0,2% (m/v, diluída com ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹) preparada utilizando o SAQQ sintetizado conforme procedimento descrito por Qin e colaboradores (2004) utilizando a QTS da Companhia Purifarma (São Paulo, SP, Brasil) e o cloreto de trimetil glicidil amônio (CTGA, teor \geq 90% m/m) adquirido da Fluka Chemica (São Paulo, SP, Brasil).

4.3 INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES DO MÉTODO

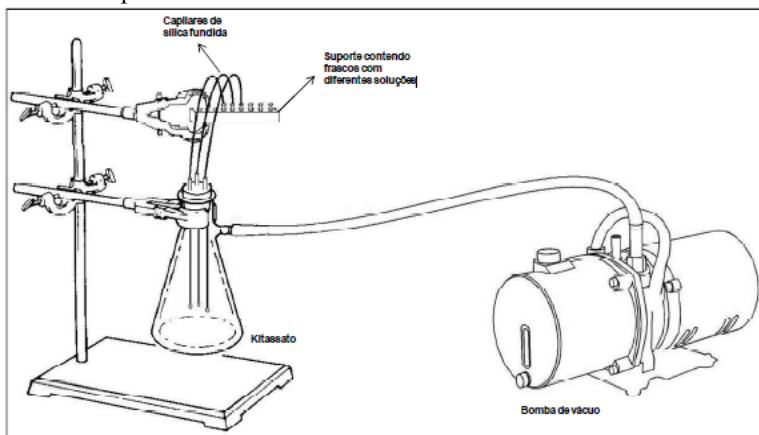
As medidas foréticas foram conduzidas no equipamento de CE da marca Agilent Technologies, Modelo 7100 (Palo Alto, CA, USA), equipado com um detector de arranjo de diodos. O controle, a aquisição e o tratamento de dados obtidos foram realizados com o software *ChemStation*[®] fornecido pelo fabricante do equipamento de CE. Para as determinações foram utilizados capilares de sílica fundida revestidos

externamente com poliacrilato (Microtube, Araraquara, SP, Brasil), 48,5 cm comprimento total, sendo 40 cm de efetivo ($75\ \mu\text{m}$ d.i. x $375\ \mu\text{m}$ d.e.), mantidos a uma temperatura de $25\ ^\circ\text{C}$ durante as corridas. O eletrólito de corrida foi composto por $30\ \text{mmol L}^{-1}$ ácido aminocapróico e $24\ \text{mmol L}^{-1}$ ácido perclórico, $\text{pH} = 3,85$, preparado diariamente. Padrões e amostras foram injetados na extremidade mais longa do capilar por pressão hidrodinâmica de 50 mbar por 40 segundos. A voltagem de separação foi de 30 kV com polaridade negativa no sítio de injeção e detecção em 210 nm. As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro Micronal, modelo B474, com eletrodo de referência de Ag/AgCl.

4.4 COLUNAS CAPILARES

O método desenvolvido neste estudo foi aplicado em capilares de sílica fundida não revestidos e revestidos com SAQQ. O condicionamento e o revestimento das colunas capilares foram realizados externamente ao equipamento de CE a fim de economizar tempo de uso do equipamento e da lâmpada de deutério, além de aumentar a vida útil da bomba de pressão e facilitar o preparo dos revestimentos. Pois o sistema apresenta como vantagem a possibilidade de revestir vários capilares ao mesmo tempo. Esse sistema está apresentado na Figura 9.

Figura 9. Esquema representando o sistema utilizado para realizar o condicionamento e revestimento de capilares fora do equipamento de eletroforese capilar.



Fonte: VITALI, 2012.

4.4.1 Condicionamento do capilar de sílica não revestido

O capilar foi condicionado com hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}) por 30 minutos, seguido de água desionizada por 30 minutos e depois com o BGE por 15 minutos. Entre as corridas o capilar não revestido foi condicionado durante 1 minuto com o BGE. Entre dias diferentes o capilar foi condicionado com hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}) por 10 minutos, seguido de água desionizada por 10 minutos e depois com o BGE por 15 minutos.

4.4.2 Revestimento do capilar com SAQQ

O procedimento de revestimento do capilar iniciou com o condicionamento do capilar de sílica com hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}) por 30 minutos, seguido de água desionizada por 30 minutos. Após o pré-condicionamento o capilar foi lavado com solução de SAQQ 0,2% m/v (diluída com ácido clorídrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) por 5 minutos e mantido em contato estático por mais 5 minutos. Posteriormente o capilar foi condicionado com eletrólito de corrida por 15 minutos. Entre as corridas o capilar revestido foi condicionado durante 1 minuto com o eletrólito de corrida. Entre dias diferentes o capilar foi condicionado somente lavando com a solução de SAQQ 0,2% m/v por 5 minutos e mantido em contato estático por mais 5 minutos, seguido do condicionamento com o eletrólito de corrida por 15 minutos.

4.4.3 Estabilidade do capilar revestido com SAQQ ao longo das corridas

A durabilidade do revestimento com SAQQ foi avaliada através da injeção em triplicata de uma amostra de leite preparada conforme descrito no Item 4.5.1. e posteriormente fortificada com os padrões dos analitos e padrão interno. A amostra foi injetada quarenta vezes no aparelho de CE. O capilar foi condicionado com o BGE por 1 minuto entre as corridas. Ao fim de cada corrida o EOF foi medido utilizando acetona como marcador de fluxo. Os resultados obtidos foram avaliados calculando o coeficiente de variação (CV) para verificar a necessidade de realizar o procedimento de reconstrução do revestimento de SAQQ.

4.4.4 Reconstrução do revestimento de SAQQ

A reconstrução do revestimento do capilar foi realizada após verificar a estabilidade do revestimento ao longo das corridas, conforme o procedimento 4.4.3. Para reconstrução do revestimento de SAQQ o capilar foi condicionado com hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}) por 10 minutos, seguido de água desionizada por 10 minutos e depois lavado com solução de SAQQ 0,2% m/v por 5 minutos e mantido em contato estático por mais 5 minutos, posteriormente o capilar foi condicionado com eletrólito de corrida por 15 minutos.

4.5 COMPOSIÇÃO DO ELETRÓLITO DE CORRIDA

Os componentes do BGE foram selecionados através de simulações realizadas no *software PeakMaster*[®]. Considerou-se características como mínima absorção da radiação eletromagnética na região de detecção, pH ideal para separação completa dos analitos, uma boa capacidade tamponante e mínima assimetria das bandas devido a efeitos de dispersão por eletromigração (EMD, do inglês “*Electromigration Dispersion*”). O modo de detecção foi o direto pois os analitos têm máximo de absorção próximo ao comprimento de onda de 210 nm. Para escolha das concentrações de cada componente do BGE e com o intuito de obter condições ideais de separação foram realizadas simulações no *software PeakMaster*[®], fixando a concentração de ácido aminocapróico (30 mmol L^{-1}) e variando a concentração de ácido perclórico.

A avaliação da existência do efeito Joule foi testada verificando se a lei de Ohm foi respeitada após a variação da corrente em função da aplicação de diferentes tensões em BGE com diferentes forças iônicas. A lei de Ohm é representada pela Equação 5.

$$V = R i \quad (5)$$

Onde V é a diferença de potencial elétrico ou tensão em volts, R a resistência elétrica e i é a intensidade da corrente elétrica medida em amperes. Uma boa correlação linear entre a corrente e a tensão para uma dada força iônica indica um efeito Joule minimizado ou desprezível.

4.6 AMOSTRAS

Foram analisadas doze amostras de diferentes marcas, destas, seis amostras eram de leite bovino, três amostras de extrato hidrossolúvel de soja e três amostras de leite caprino. As amostras foram obtidas no comércio local no período de janeiro a dezembro de 2016 (Florianópolis/SC).

4.6.1 Preparo de amostra

O processo de preparo das amostras iniciou com a homogeneização por agitação vigorosa da amostra e posterior retirada de 500 µL para um microtubo. Neste microtubo adicionou-se 1000 µL de acetonitrila, suficiente para promover a precipitação das proteínas do leite. Posteriormente, cada microtubo contendo amostra foi submetido à centrifugação de 14.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi coletado e diluído com o padrão interno bromato na proporção 9:1 e reservado para injeção no equipamento de CE. A concentração final do padrão interno na amostra foi mantida constante em 10 mg L⁻¹. As amostras foram analisadas quanto ao teor de nitrato, nitrito e tiocianato através do método de separação desenvolvido e selecionado neste estudo. Todas as amostras foram preparadas em triplicata e injetadas no aparelho de eletroforese capilar.

Verificou-se a possibilidade de injeção da amostra sem a etapa de precipitação com acetonitrila, em capilar não revestido e revestido com SAQQ. Desta forma a amostra sofre homogeneização por agitação e posterior retirada de 500 µL para um microtubo. Neste microtubo adicionou-se 1000 µL de água deionizada. Posteriormente, cada microtubo contendo amostra foi submetido à centrifugação de 14.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi coletado e diluído com os padrões na proporção 1:1 e reservado para injeção no equipamento de CE.

4.6.2 Ensaios de pré-concentração dos analitos

Uma amostra de leite bovino fortificada com os analitos de interesse foi injetada no aparelho de CE utilizando um capilar de sílica não revestido e variando o tempo de injeção de 5 a 60 segundos com pressão hidrodinâmica fixada em 50 mbar. Através dos eletroferogramas obtidos foi possível obter um gráfico que relaciona a resolução e altura

dos picos com o tempo de injeção. Relacionando a melhor resolução obtida com a maior altura dos picos dos analitos, selecionou-se o tempo de injeção adequado para ser adotado no método de análise proposto.

4.7 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Os parâmetros de validação do método foram realizados em capilares de sílica fundida não revestidos e revestidos com SAQQ. Foram avaliados: conformidade do sistema; linearidade; efeito de matriz; seletividade; precisão; exatidão e limites de detecção e quantificação. Os estudos de validação foram realizados em três tipos de amostras: leite bovino, caprino e extrato hidrossolúvel de soja. Os parâmetros analíticos foram avaliados segundo protocolos de validação de métodos como o INMETRO, ANVISA e AOAC.

4.7.1 Conformidade do sistema

O teste de conformidade do sistema foi realizado considerando o CV das médias obtidas de dez injeções consecutivas de solução padrão em três níveis de concentração, sendo eles: inferior próximo ao primeiro ponto da curva, intermediário e superior, próximo ao último ponto da curva. Os parâmetros avaliados foram: área do pico corrigida (Área analito/Área P.I.); tempo de migração; resolução e número de pratos. A AOAC (2016) considera adequados CV da ordem de até 11%, para níveis de concentração da ordem de mg L^{-1} .

4.7.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir das curvas de calibração em solução padrão construída em triplicata e em sete níveis de concentrações distribuídos de forma equidistante. A faixa de trabalho estudada foi de 0,1 a 10,0 mg L^{-1} e de 0,1 a 4,0 mg L^{-1} para capilares não revestidos e revestido com SAQQ, respectivamente. Os parâmetros das curvas de calibração foram obtidos através de regressão linear, também foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), homoscedasticidade pelo teste de Cochran (COCHRAN, 1941) e o ajuste ao modelo linear foi feito empregando o teste F (SNEDECOR e COCHRAN, 1989). O gráfico dos resíduos foi realizado para verificar a presença de valores discrepantes (*outliers*). Por fim realizou-se o teste de Grubbs para confirmação dos

possíveis *outliers* (GRUBBS, 1969). Todos os testes estatísticos foram realizados com nível de significância de 5%. A ANVISA (2016) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90.

4.7.3 Efeito de matriz

As curvas de calibração na matriz foram construídas usando o método de adição de padrão nas matrizes de leite bovino, caprino e extrato hidrossolúvel de soja. Para verificação do ajuste ao modelo linear, os mesmos testes estatísticos aplicados à curva de solução padrão foram repetidos para a curva de matriz, em relação à presença de *outliers* e quanto às premissas de normalidade, homoscedasticidade e ajuste ao modelo linear. Para avaliação do efeito de matriz, fez-se a comparação das inclinações das curvas em solução padrão e das curvas de adição de padrão, através da aplicação do teste F verificou-se se as variâncias eram equivalentes ou diferentes. Em seguida o teste *t* específico para cada caso era aplicado, confirmando ou não o efeito de matriz.

4.7.4 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através dos *softwares ChemStation*[®] e *PeakMaster*[®]. O equipamento de CE da marca Agilent Technologies traz no *software ChemStation*[®] uma ferramenta que permite avaliar experimentalmente a pureza do pico. Isto possibilita verificar se ocorre a sobreposição de picos avaliada pela análise dos espectros de UV coletados pelo detector de arranjo de diodos. O *PeakMaster*[®] foi utilizado para simular variações da composição do eletrólito de corrida e avaliar o efeito sobre o perfil de separação dos analitos de interesse.

4.7.5 Precisão

A precisão intra-ensaio foi determinada a partir de dez injeções consecutivas de soluções dos padrões de nitrato, tiocianato e nitrito em três níveis de concentrações. A precisão inter-ensaio foi verificada através da injeção de padrões de nitrato, tiocianato e nitrito em três níveis de concentrações, injetados em três dias consecutivos. Em ambas a concentração do padrão interno bromato foi constante (10 mg L⁻¹) e o

CV foi avaliado em função do tempo de migração e área do pico corrigida. A AOAC (2016) considera adequados CV da ordem de até 11%, para níveis de concentração da ordem de mg L⁻¹.

4.7.6 Exatidão

A exatidão do método proposto foi verificada de duas formas. Primeiramente através de testes de recuperação de amostras fortificadas em três níveis de concentrações, próximo ao primeiro ponto da faixa de trabalho, nível intermediário e próximo ao último ponto da faixa de trabalho, injetados em triplicata. Para os cálculos de recuperação das amostras utilizou-se a Equação 6:

$$Rec(\%) = \frac{(Conc\ amostra\ fortificada) - (Conc\ amostra\ não\ fortificada)}{Conc\ Adicionada} \times 100 \quad (6)$$

Em um segundo momento com a finalidade de realizar um método comparativo para determinação de nitritos e nitratos, selecionou-se três amostras de extrato hidrossolúvel de soja para aplicação do método de referência da IN nº68/ 2006 do MAPA. O laboratório LABCAL/CCA-UFSC realizou os ensaios, adotando como LQ e LD o valor de 1,5 e 0,5 mg L⁻¹, respectivamente. Posteriormente as mesmas amostras foram analisadas através do método desenvolvido no presente estudo, porém utilizando capilares não revestidos. Em ambos os métodos as análises foram realizadas em triplicata. Para verificar se há diferença significativa entre os resultados obtidos nos diferentes métodos aplicados, fez-se a comparação dos resultados obtidos no método por CZE proposto no presente estudo e o método de referência. Através da aplicação do teste F verificou-se se as variâncias eram equivalentes ou diferentes. Em seguida o teste *t* específico para cada caso foi aplicado, confirmando se há diferenças significativas entre os resultados obtidos nos diferentes métodos para cada amostra.

4.7.7 Limites de detecção e quantificação

Os LD e LQ foram obtidos usando razão sinal/ruído. O LD do método equivale a três vezes a relação sinal/ruído, já o LQ foi estabelecido como 10 vezes a razão do sinal/ruído (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA; 1998; RIBEIRO et al., 2008). Os valores de LD e LQ também foram calculados utilizando os parâmetros da curva

analítica, onde o LD e o LQ pode ser expressos como exemplifica as Equações 7 e 8:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (7)$$

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad (8)$$

Onde o s representa a estimativa do desvio padrão do intercepto e o S representa a inclinação da curva de calibração.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO DO ELETRÓLITO DE CORRIDA

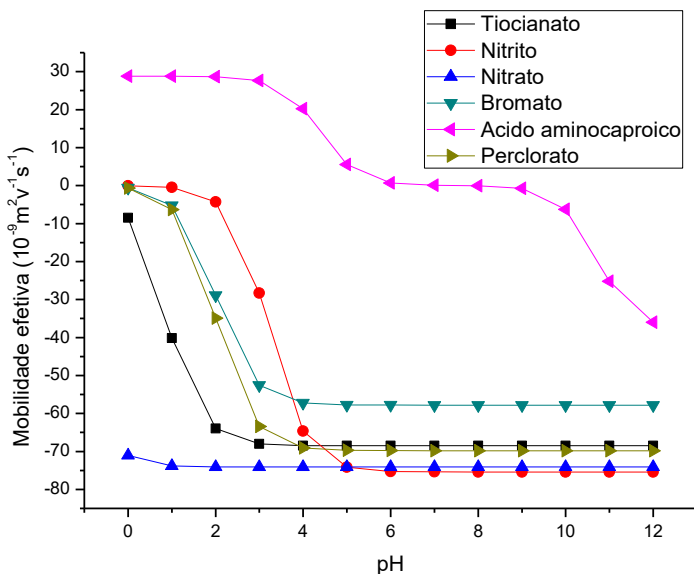
Através das simulações realizadas no *software PeakMaster*[®] verificou-se que os íons nitrato e nitrito têm mobilidades eletroforéticas (μ) muito elevadas e próximas, conforme pode ser observado na Tabela 1. Porém em condições de pH abaixo de 4 a mobilidade do nitrito pode ser reduzida, pois nesta condição não estará completamente dissociado, desta forma o nitrito migra com menor mobilidade que o nitrato, facilitando a separação, como mostra a Figura 10. O íon tiocianato apresenta mobilidade eletroforética um pouco menor que os outros dois analitos com um pK_a menor que 1, estando desta forma completamente dissociado a partir de pH 3.

Tabela 1. Dados de pK_a e mobilidade eletroforética do nitrato, nitrito, tiocianato, perclorato, bromato e ácido aminocapróico. Dados obtidos do PeakMaster[®] software.

Nome	pK_a	Mobilidade eletroforética ($\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$)
Nitrato	-1,37	-74,1
Nitrito	3,22	-75,6
Tiocianato	0,85	-68,5
Bromato	-2,00	-57,8
Perclorato	-2,00	-69,8
Ácido aminocapróico	4,37 ; 10,75	+28,8 ; -37,8

O co-íon escolhido foi o perclorato, pois não absorve na região do ultravioleta e tem mobilidade similar a dos analitos, o que minimiza a assimetria dos picos devido a EMD. O padrão interno escolhido foi o ânion bromato, por absorver na região do ultravioleta como os analitos, além de possuir mobilidade próxima a dos analitos e não estar presente nas amostras analisadas em concentrações detectáveis pelo método proposto.

Figura 10. Curvas de mobilidade efetiva versus pH. Equação para o cálculo da mobilidade efetiva (μ_{eff}) para espécies aniônicas $\mu_{eff}, A^- = \frac{\mu_{0,A^-}}{1+10^{(pKa-pH)}}$, e equação para espécies catiônicas $\mu_{eff}, A^+ = \frac{\mu_{0,A^+}}{1+10^{(pH-pKa)}}$. Outras informações de pKa e mobilidade eletroforética ver Tabela 1.

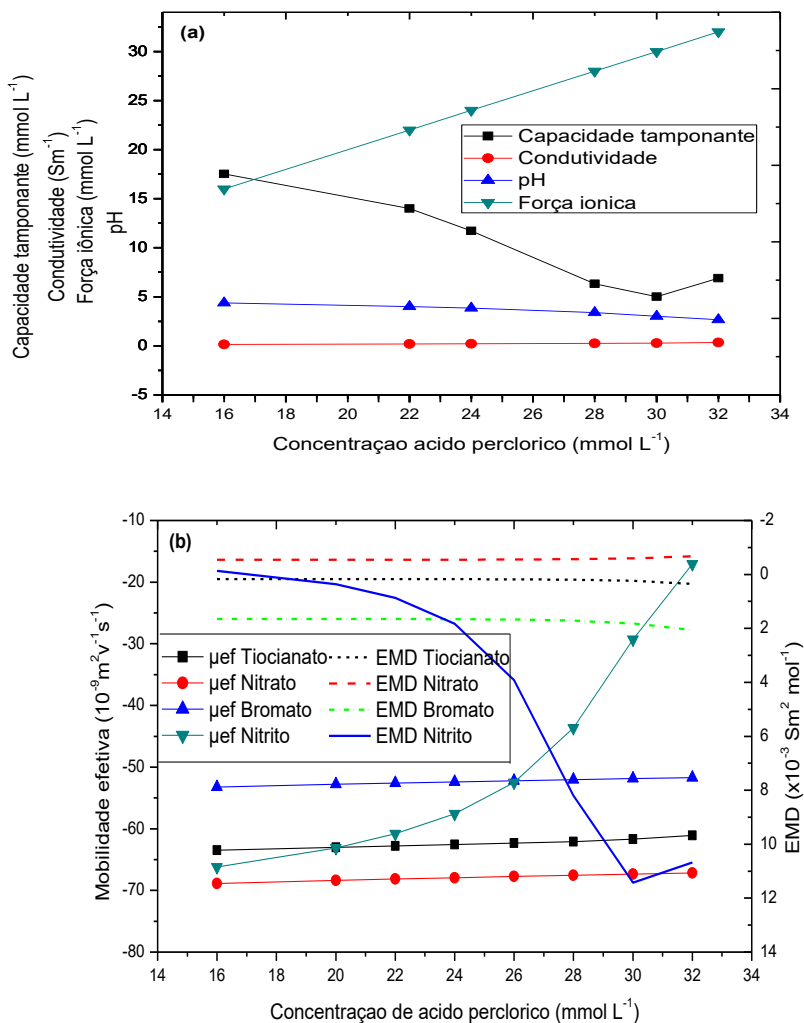


Fonte: Próprio autor.

A partir da curva de mobilidade efetiva *versus* pH, mostrada na Figura 10, definiu-se como ideal o pH de separação na faixa de 3,7 - 4,0. Tendo por base esta informação e sabendo que o perclorato não atua como tampão nessa região de pH, escolheu-se o ácido aminocaproico como contra-íon, pois este composto tem pKa 4,37 e então fornece a capacidade tamponante desejada para o BGE.

Os resultados obtidos para as simulações realizadas no *software PeakMaster*[®] com o intuito de escolher as concentrações de cada componente do BGE e desta forma obter condições ideais de separação estão dispostos através da Figura 11.

Figura 11. Otimização dos parâmetros capacidade tamponante, condutividade e força iônica do eletrólito de corrida (BGE) empregando o *software PeakMaster®* fixando a concentração de ácido aminocaprílico (30 mmol L⁻¹) e variando a concentração de ácido perclórico (16-32 mmol L⁻¹). (a) Parâmetros do BGE. (b) Mobilidade efetiva (μ_{ef}) e dispersão por eletromigração (EMD) *versus* a concentração de ácido perclórico.



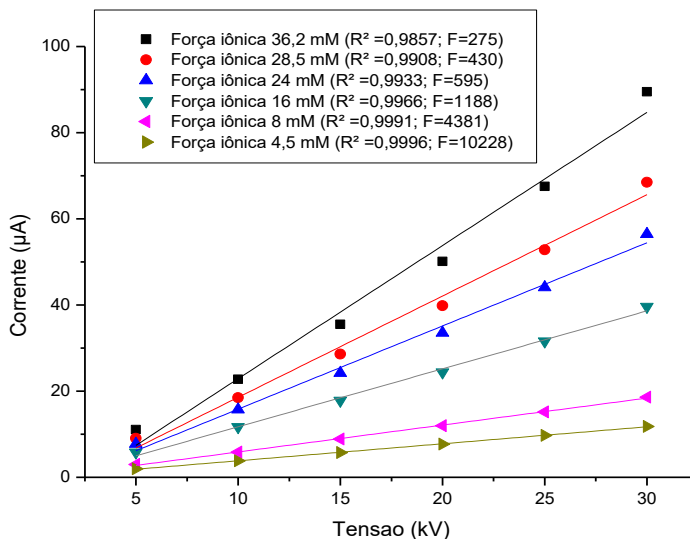
Fonte: Próprio autor.

A composição selecionada para o BGE foi ácido perclórico 24 mmol L⁻¹ e ácido aminocapróico 30 mmol L⁻¹, com essa proporção dos componentes do BGE foi observada a completa separação dos analitos de interesse e o padrão interno, além de uma baixa condutividade e menor força iônica, o que minimiza a geração de calor no capilar permitindo uso de tensão elevada para obtenção de uma separação com tempo de análise reduzido. A capacidade tamponante obtida foi cerca de 12 mmol L⁻¹, valor considerado suficiente para as separações. Além disso, esta condição forneceu menor EMD para todos os analitos e pH de 3,85 adequado à separação.

Observa-se nesta etapa de otimização do BGE que o fator preponderante na separação se deve a pequena diferença existente entre as mobilidades dos íons nitrato e nitrito. Sendo crucial o controle do pH através de um BGE com capacidade tamponante adequada. Desta forma o *software PeakMaster*® demonstrou ser uma ferramenta útil no desenvolvimento do método, sem a necessidade de realização de experimentos.

A seleção da tensão a ser empregada no método proposto foi realizada levando em consideração a obtenção de uma separação com menor tempo possível sem interferências do efeito Joule. Uma boa correlação linear entre a corrente e a tensão para uma dada força iônica indica um efeito Joule minimizado ou desprezível. Essas interferências podem provocar a deformação dos picos e a sua consequente comigração. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 12.

Figura 12. Variação da corrente em função da aplicação de tensão para o eletrólito ácido aminocapróico e ácido perclórico, pH 3,85 em diferentes forças iônicas. Entre parênteses estão os valores de coeficientes de determinação (R^2) e teste F .



Fonte: Próprio autor.

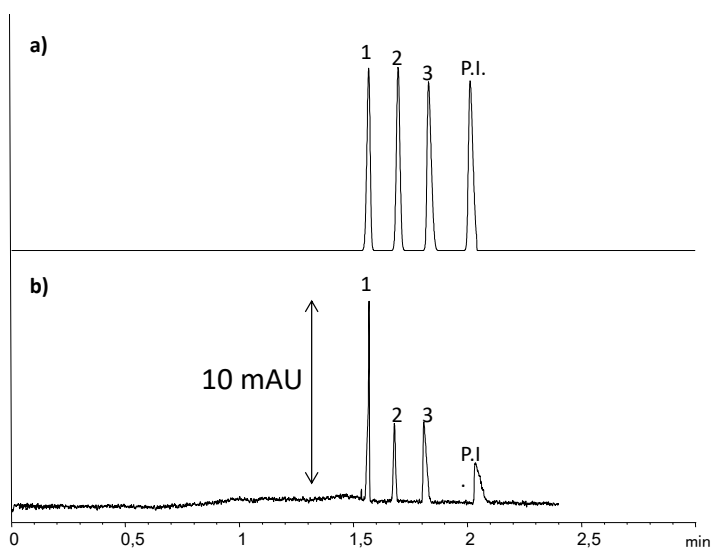
No eletrólito de força iônica 24 mmol L^{-1} foi observado um bom coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9933$) entre corrente e a tensão e o modelo linear mostrou ser significativo ($F = 595$), indicando que com esse eletrólito a lei de Ohm é obedecida. Para o eletrólito com força iônica de $28,5 \text{ mmol L}^{-1}$ foi observado um bom coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9908$), porém o modelo linear mostrou menor significância ($F = 430$). Para o eletrólito com força iônica de $36,2 \text{ mmol L}^{-1}$ foi observado coeficiente de correlação de 0,98 evidenciando o desvio da lei de Ohm e com isso uma maior tendência a existência do efeito Joule. Enquanto isso, nos eletrólitos com força iônica menores que 24 mmol L^{-1} foi verificada uma ótima relação linear da corrente e da tensão ($R^2 \geq 0,996$) permitindo o uso da tensão máxima de separação.

Os eletrólitos de menor força iônica apresentaram capacidade tamponante em cerca de 8 mmol L^{-1} , um pouco menor que o observado para o eletrólito com força iônica 24 mmol L^{-1} que apresentou cerca de

12 mmol L⁻¹ de capacidade tamponante. Assim, tendo como compromisso uma capacidade tamponante boa e a máxima tensão possível para desenvolver um método rápido de separação sem tendência ao efeito joule, optou-se pelo uso do eletrólito de força iônica 24 mmol L⁻¹ com a tensão de separação de 30 kV, sendo esta a condição a ser empregada nos próximos experimentos.

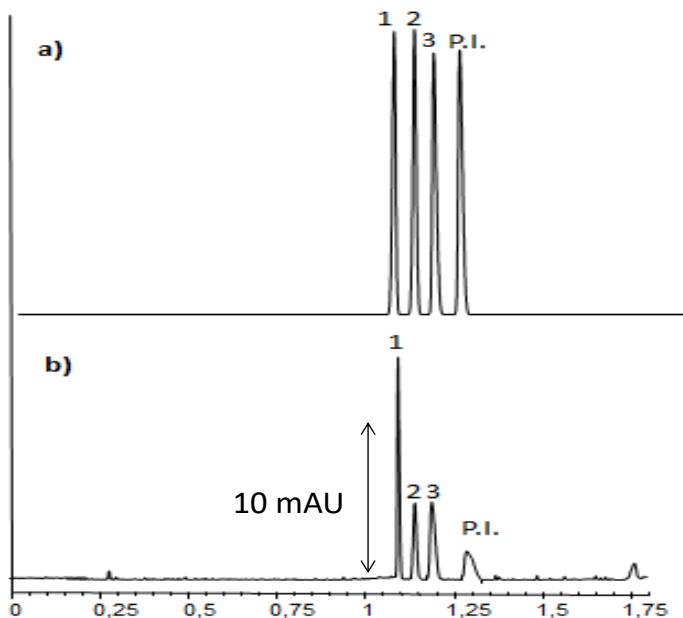
Com o objetivo de verificar se as informações obtidas através das simulações no *software PeakMaster*[®] estavam de acordo com o que ocorreria experimentalmente, foi realizada uma análise experimental utilizando as condições selecionadas. As Figuras 13 e 14 apresentam os eletroferogramas simulados no *software PeakMaster*[®] e o obtidos experimentalmente, utilizando capilar de sílica não revestido e revestido com SAQQ, respectivamente.

Figura 13. Eletroferograma da separação dos analitos em capilar de sílica não revestido (a) simulação utilizando o *software PeakMaster*[®] e (b) Experimental em matriz de leite com adição dos padrões. Condições de separação: 24 mmol L⁻¹ de ácido perclórico e 30 mmol L⁻¹ de ácido aminocapróico, pH 3,85, injeção 50 mbar, 5 s, -30 kV, Capilar com 48,5 cm de comprimento total (40 cm efetivo × 75 μm diâmetro interno), detecção direta em 210 nm. Legenda: 1-Nitrato; 2-Tiocianato; 3- Nitrito; P.I.- Bromato.



Fonte: Próprio autor.

Figura 14. Eletroferograma da separação dos analitos em capilar de sílica revestido com sal de quitosana quaternizada (Fluxo eletro-osmótico $31 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) (a) simulação utilizando o *software PeakMaster*[®] e (b) Experimental em matriz de leite com adição dos padrões. Condições de separação: 24 mmol L⁻¹ de ácido perclórico e 30 mmol L⁻¹ de ácido aminocapróico, pH 3,85, injeção 50 mbar, 5 s, -30 kV, Capilar com 48,5 cm de comprimento total (40 cm efetivo \times 75 μm diâmetro interno), detecção direta em 210 nm. Legenda: 1- Nitrato; 2-Tiocianato; 3- Nitrito; P.I.- Bromato.

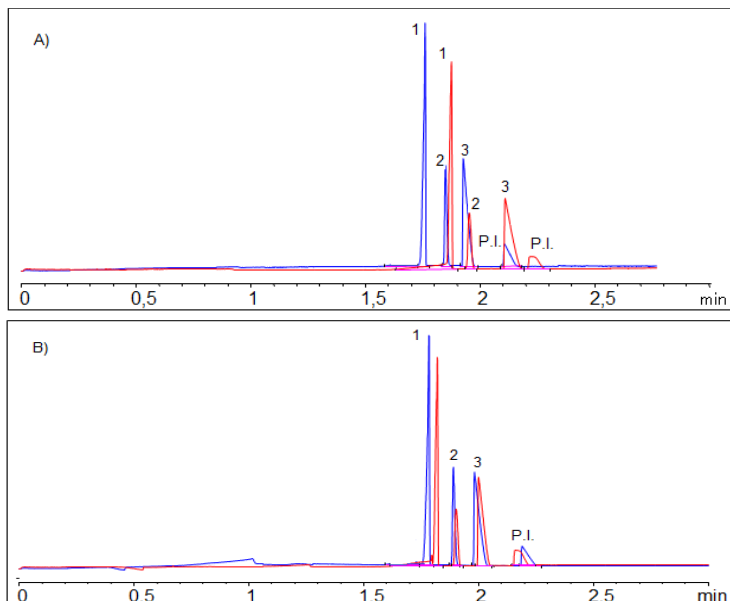


Fonte: Próprio autor.

Percebe-se através da comparação que há similaridade entre os eletroferogramas, o que reafirma que as condições de separação foram escolhidas corretamente para o propósito. Além disso, aparentemente não foi observado nenhum interferente na matriz da amostra que possa comprometer a separação de interesse.

Com a finalidade de verificar a durabilidade da capacidade tamponante do eletrólito o perfil de separação dos analitos foi observado a cada cinco corridas consecutivas. A Figura 15 exibe o perfil obtido para a separação dos padrões em meio aquoso na 1^a corrida e após a 20^a corrida consecutiva.

Figura 15. Eletroferograma da separação dos analitos em meio aquoso na 1ª corrida e após a 20ª corrida consecutiva. (a) Sem troca de eletrólito e (b) com troca do eletrólito a cada cinco corridas consecutivas. Condições de separação: 24 mmol L⁻¹ de ácido perclórico e 30 mmol L⁻¹ de ácido aminocaprílico, pH 3,84, injeção 50 mbar, 40 s, -30 kV, Capilar de sílica não revestido com 48,5 cm de comprimento total (40 cm efetivo × 75 μm diâmetro interno), detecção direta em 210 nm. Legenda: 1-Nitrato; 2-Tiocianato; 3- Nitrito; P.I.- Bromato.



Fonte: Próprio autor.

Através dos perfis obtidos é possível verificar que o pH do eletrólito sofre alterações significativas após a 5ª corrida consecutiva. Pode estar ocorrendo uma eletrólise no BGE fazendo com que ocorra uma diminuição do pH. Esta pequena alteração no pH altera a mobilidade do nitrito que fica mais lento em pH menores. Observou-se uma diminuição da corrente ao longo das corridas sem a troca do BGE. Isto pode alterar o perfil de separação, deslocando o conjunto dos picos para tempos maiores. Outra justificativa para o descolamento do conjunto dos picos poderia ser a interferência da matriz da amostra que interage com a parede do capilar não revestido mais intensamente ao longo das corridas. Percebeu-se que o deslocamento do nitrito é mais evidente do que o deslocamento do conjunto dos picos ao longo das corridas.

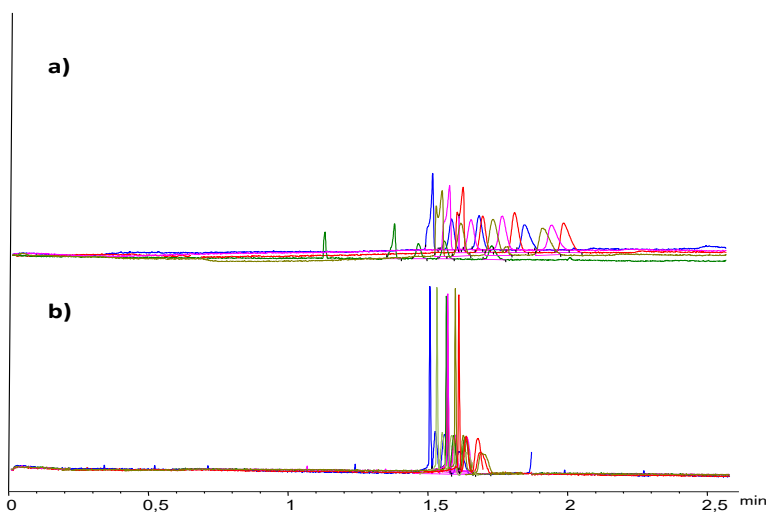
Desta forma optou-se pela troca do eletrólito de corrida a cada cinco corridas consecutivas.

5.2 AMOSTRAS

5.2.1 Influência do solvente orgânico no preparo das amostras

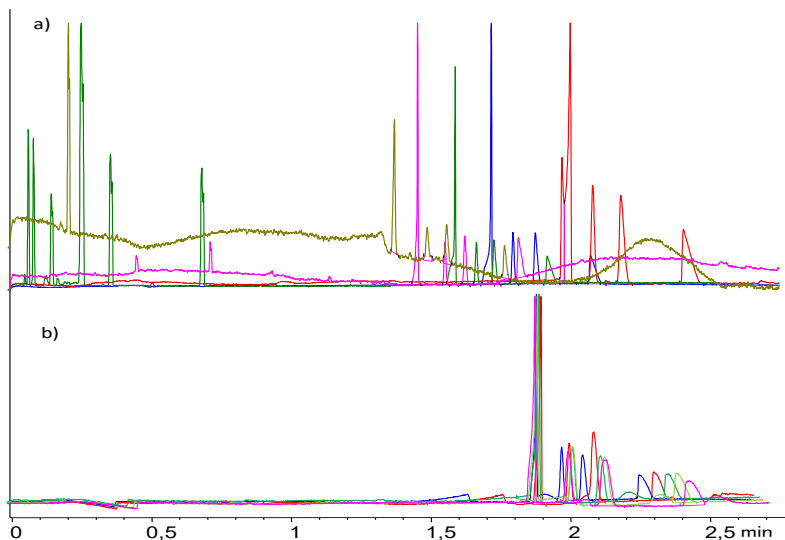
O leite é uma amostra com alta carga de proteína em sua constituição o que pode afetar as separações em CZE por adsorção nas paredes do capilar. Porém, a sua remoção consiste em uma etapa adicional no processo de preparo das amostras. Os problemas associados à presença de proteínas nas amostras podem ser minimizados em capilares revestidos. Dessa forma, foi avaliada a possibilidade de injeção de amostras com e sem a etapa de precipitação de proteínas empregando acetonitrila, em capilar revestido com SAQQ e não revestido. Essa avaliação foi feita com o objetivo de justificar a utilização do solvente no processo de preparo de amostra. Os resultados obtidos estão apresentados em forma de eletroferogramas nas Figuras 16 e 17.

Figura 16. Eletroferogramas obtidos após cinco injeções consecutivas de amostras fortificadas com os padrões injetadas em capilar de sílica revestido com sal de quitosana quaternizada. a) sem o processo de precipitação de proteínas da amostra, b) com o processo de precipitação de proteínas da amostra. Condições de separação: 24 mmol L⁻¹ de ácido perclórico e 30 mmol L⁻¹ de ácido aminocapróico, pH 3,84, injeção 50 mbar, -30 kV, Capilar com 48,5 cm de comprimento total (40 cm efetivo × 75 μm diâmetro interno), detecção direta em 210 nm.



Fonte: Próprio autor.

Figura 17. Eletroferogramas obtidos após cinco injeções consecutivas de amostras fortificadas com os padrões injetadas em capilar de sílica não revestido a) sem o processo de precipitação de proteínas da amostra, b) com o processo de precipitação de proteínas da amostra. Condições de separação: 24 mmol L⁻¹ de ácido perclórico e 30 mmol L⁻¹ de ácido aminocaprílico, pH 3,84, injeção 50 mbar, -30 kV, Capilar com 48,5 cm de comprimento total (40 cm efetivo× 75 μm diâmetro interno), detecção direta em 210 nm.



Fonte: Próprio autor.

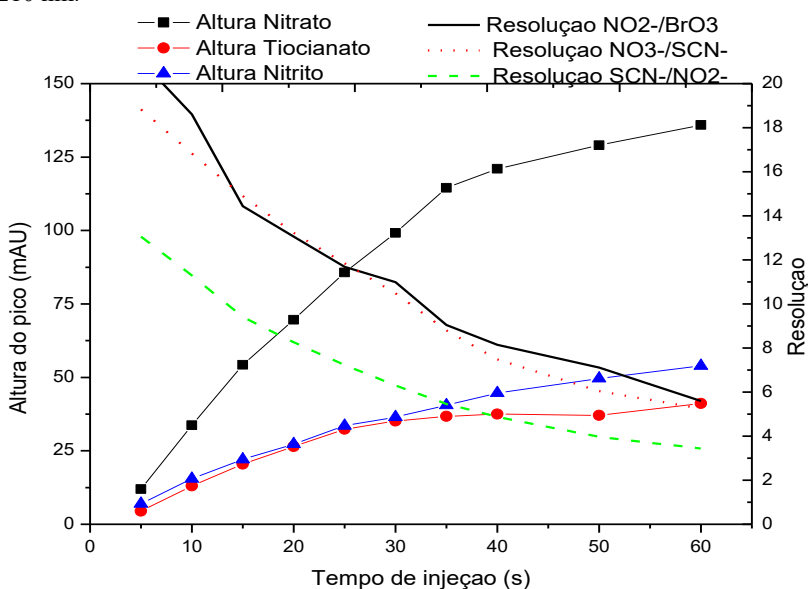
De acordo com os eletroferogramas obtidos nas Figuras 16 e 17 a adição de acetonitrila para precipitação das proteínas se faz necessária tanto no capilar revestido quanto no capilar não revestido. No capilar revestido o procedimento de precipitação das proteínas da amostra deve ser realizado com o objetivo de aumentar a vida útil do capilar e garantir a melhor resolução dos picos. Já no capilar não revestido observou-se que a não precipitação expõe o capilar a fortes interações entre a sílica e as proteínas presentes na amostra, alterando completamente o perfil de separação dos analitos.

5.2.2 Ensaios de pré-concentração dos analitos

Com o objetivo de aumentar o sinal analítico obtido e consequentemente realizar uma pré-concentração dos analitos optou-se pela injeção de maiores volumes de amostra através da variação do

tempo de injeção de 5 a 60 segundos. Através dos eletroferogramas obtidos foi possível obter o gráfico da Figura 18 que relaciona a resolução e altura dos picos com o tempo de injeção.

Figura 18. Altura do pico e resolução dos padrões em função do tempo de injeção no estudo de pré-concentração do método proposto para determinação de nitrato, nitrito e tiocianato. Condições de injeção: Eletrólito ácido aminocapróico 30 mmol L⁻¹ e ácido perclórico 24 mmol L⁻¹, -50 mbar; tensão -30 kV; tempo de condicionamento entre corridas com eletrólito 0,5 min. Capilar de sílica fundida não revestido com comprimento total de 48,5 cm e efetivo de 40 cm e 75 μm diâmetro interno. Dados adquiridos do comprimento de onda 210 nm.



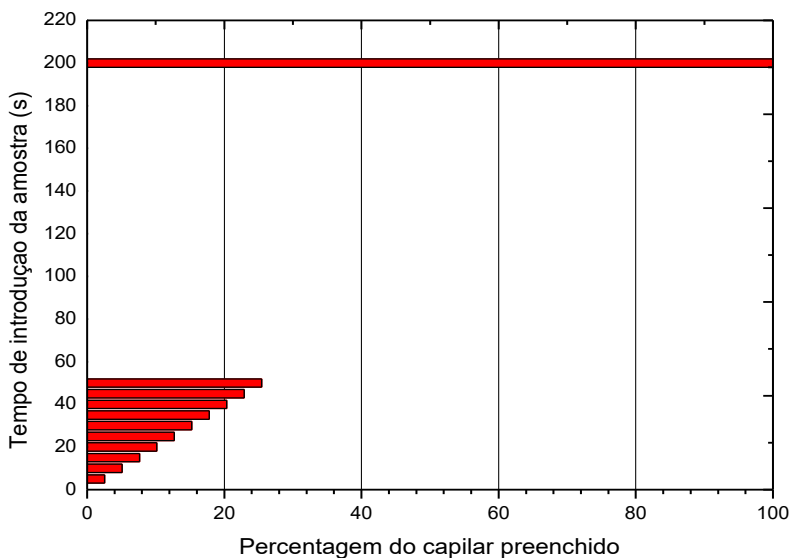
Fonte: Próprio autor

De acordo com análise da Figura 18 pode-se observar que com o aumento do tempo de injeção percebe-se um aumento representativo na altura de pico e queda na resolução até 35 segundos. Depois desse tempo de injeção este comportamento permanece, porém de forma menos pronunciada. Dessa forma, o tempo de injeção selecionado foi de 40 s.

Utilizando equações matemáticas que relacionam o comprimento e diâmetro do capilar, além da pressão hidrodinâmica utilizada foi possível verificar a porcentagem do capilar ocupada com a amostra no

momento de cada injeção utilizando a pressão de 50 mBar. A Figura 19 ilustra a percentagem do capilar de sílica preenchido até o detector com a amostra *versus* o tempo de introdução da amostra. Desta forma foi possível verificar que para o tempo de injeção selecionado de 40 s apenas 20% do capilar estão preenchidos com a amostra. Isso assegura que o capilar estará preenchido majoritariamente com o BGE, o que manterá o bom perfil de separação do método proposto por CZE de acordo com a simulação realizada.

Figura 19. Percentagem do capilar de sílica preenchida até o detector com a amostra *versus* o tempo de introdução da amostra. Equações para cálculo da quantidade de amostra introduzida no capilar (Q), $Q = (\text{volume})_{\text{int}}[\text{concentração}]$; $Q = \pi r^2 l [Ci]$, onde r = raio interno do capilar e l = comprimento do plug de amostra ; $l = \left[\frac{\Delta P r^2 t_{\text{int}}}{8 \eta L} \right]$, onde ΔP = variação da pressão, t_{int} = tempo de introdução de amostra, η = viscosidade da solução, L = comprimento total do capilar; $(\text{volume})_{\text{int}} = \pi r^2 \left[\frac{\Delta P r^2 t_{\text{int}}}{8 \eta L} \right] [Ci]$. Os cálculos foram realizados considerando a viscosidade da solução aquosa de $8,9 \times 10^{-4} \text{ N s m}^{-2}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$; variação da pressão de 50 mBar; capilar com diâmetro de $75 \text{ }\mu\text{m}$; comprimento total de 48,5 cm e efetivo de 40 cm.

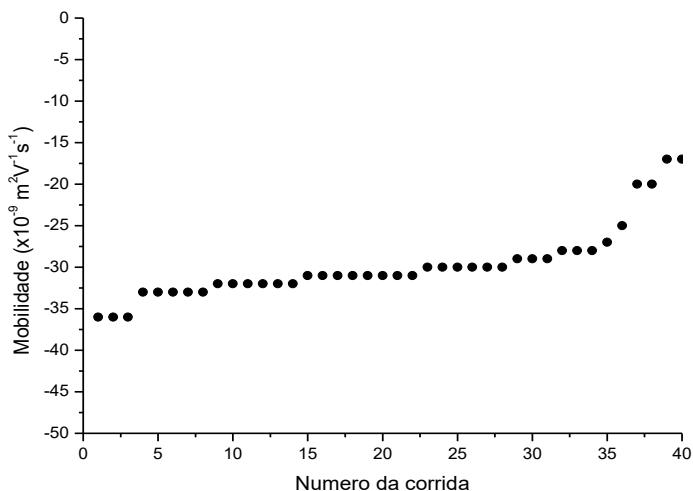


Fonte: Próprio autor.

5.3 ESTABILIDADE DO CAPILAR REVESTIDO AO LONGO DAS CORRIDAS

A durabilidade do revestimento com SAQQ foi avaliada através da injeção em triplicata de uma amostra de leite preparada conforme descrito no Item 4.4.1. e posteriormente fortificada com os padrões dos analitos e padrão interno. Este estudo foi realizado considerando a troca do eletrólito de corrida a cada cinco corridas consecutivas. A Figura 20 apresenta o gráfico que relaciona o EOF obtido ao fim de cada corrida.

Figura 20. Medida do fluxo eletro-osmótico *versus* número de corrida durante a injeção de amostra fortificada com padrões em capilar revestido com sal de quitosana quaternizada. Condições de injeção: Eletrólito ácido aminocaprílico 30 mmol L⁻¹ e ácido perclórico 24 mmol L⁻¹, pH 3,85, -50 mbar por 40s; tensão -30 kV; tempo de condicionamento entre corridas com eletrólito 1 min. Capilar de sílica fundida não revestido com comprimento total de 48,5 cm, efetivo de 40 cm e diâmetro interno de 75 µm. Dados adquiridos do comprimento de onda 210 nm.



Fonte: Próprio autor.

Através dos resultados obtidos optou-se por utilizar o capilar revestido em até 35 corridas consecutivas, sem a necessidade reconstrução do revestimento de SAQQ. Os valores de mobilidade médios do EOF determinados foram $-31 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CV = 7,0%).

5.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

5.4.1 Conformidade do sistema

Os resultados de CV para a precisão instrumental avaliando os parâmetros tempo de migração e razão de área do pico, bem como a resolução e o número de pratos utilizando capilares não revestidos e revestidos com SAQQ estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros obtidos através de dez injeções consecutivas de soluções padrões em três níveis de concentração (inferior, intermediário e superior), utilizando capilares não revestidos e revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).

	Coeficiente de Variação ^a (%)		Resolução ^b	Número de pratos médio ^c (N m ⁻¹)
	Tempo de migração	Área do pico corrigida		
Capilar não revestido				
NO ₃ ⁻	3,25	9,40	7,90 R _{NO₃,SCN}	108.452,6
SCN ⁻	3,10	8,84	4,85 R _{SCN,NO₂}	114.286,3
NO ₂ ⁻	3,20	8,81	10,38 R _{NO₂,BrO₃}	108.006,0
Capilar revestido com SAQQ				
NO ₃ ⁻	2,34	3,12	5,49 R _{NO₃,SCN}	132.707,3
SCN ⁻	2,68	2,63	4,00 R _{SCN,NO₂}	92.225,8
NO ₂ ⁻	2,88	2,45	5,91 R _{NO₂,BrO₃}	55.531,5

- (a) Coeficiente de variação calculado através da equação: $CV = (P / U) \times 100$, em que P é o desvio padrão absoluto e U é a média aritmética das razões de áreas da substância a analisar pela área do padrão interno ou média aritmética do tempo de migração.
- (b) Resolução calculado como: $R = 2 (T_n - T_{n-1}) / (W_n + W_{n-1})$, em que T é o tempo de pico de migração e W é a largura da base.
- (c) Número de pratos calculados de acordo com a equação, $N = 5.54 (T_i / W_{1/2})^2$, em que T_i é o tempo de migração do analito dado em min e W_i é a largura de banda a meio altura, em min.

Os resultados mostram que o método empregado no capilar de sílica revestido com SAQQ apresentou menor CV (2,34 a 3,12%) que o método empregado no capilar de sílica não revestido (CV de 3,10 a 9,40%). A AOAC (2016) considera adequados CV da ordem de até 11%, para níveis de concentração da ordem de mg L⁻¹. Porém a utilização de capilares revestidos diminuiu a resolução dos picos e o número de pratos na separação. Segundo RIBANI et. al. (2004)

considera-se adequadas resoluções maiores do que 2 entre o pico de interesse e o interferente mais próximo e número de pratos maiores que 2.000 para HPLC (não há referência deste parâmetro para CE). Estes resultados demonstram que os sistemas em análise são adequados para o uso em procedimentos de validação.

5.4.2 Linearidade

As curvas de calibração externa foram construídas utilizando soluções padrões dos analitos, mantendo o padrão interno a uma concentração constante (10 mg L⁻¹). Cada nível de concentração foi preparado e injetado em triplicata. A partir dos resultados das análises utilizando capilares não revestidos e revestidos com SAQQ, foram gerados os gráficos de regressão linear, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Resultados de linearidade, limites de detecção e quantificação do modelo linear do método otimizado utilizando capilares de sílica não revestidos e revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).

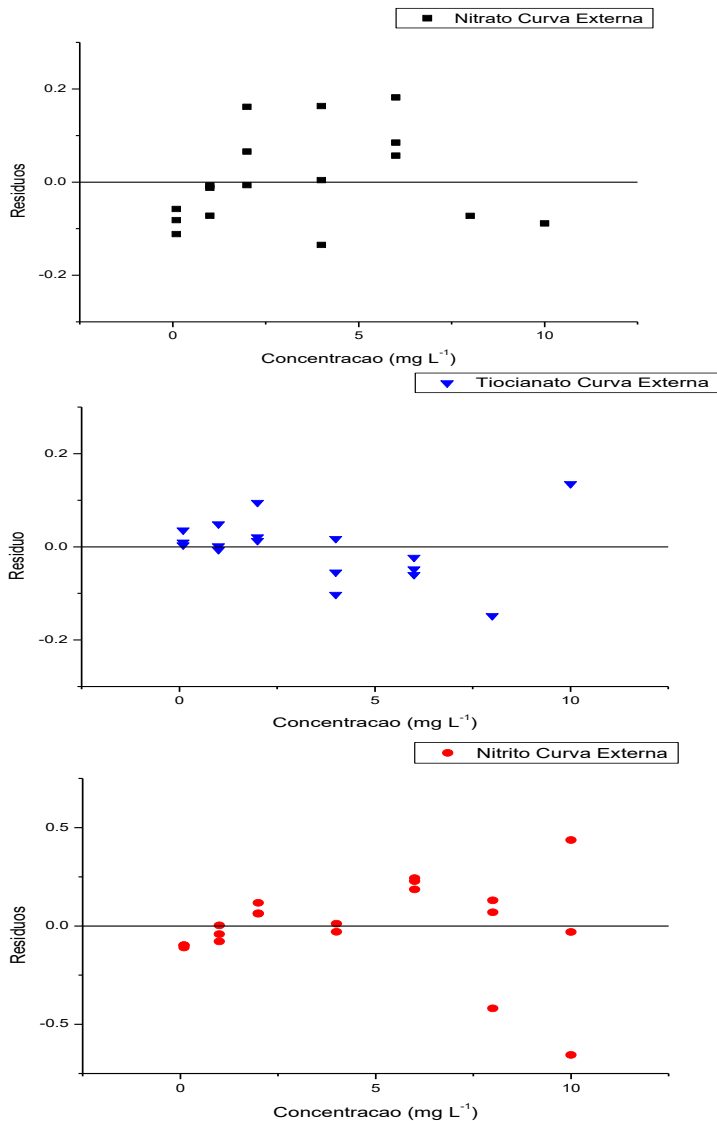
Parâmetros	Analitos		
	NO ₃ ⁻	SCN ⁻	NO ₂ ⁻
Capilar não revestido			
Linearidade-faixa de calibração (mg L ⁻¹) ^a		0,1-10,0	
Linearidade-inclinação (L mg ⁻¹) ^a	1,1672	0,5667	1,0300
Desvio padrão inclinação ^a	0,0089	0,0082	0,0157
Linearidade-intercepto ^a	0,1481	0,0005	0,1231
Desvio padrão intercepto ^a	0,0501	0,0461	0,0885
Linearidade-coeficiente determinação (R ²) ^a	0,9997	0,9987	0,9986
Capilar revestido com SAQQ			
Linearidade-faixa de calibração (mg L ⁻¹) ^a	0,1-4,0	0,1-4,0	0,1-4,0
Linearidade-inclinação (L mg ⁻¹) ^a	1,1756	0,5392	1,0000
Desvio padrão inclinação ^a	0,0314	0,0089	0,0145
Linearidade-intercepto ^a	0,0564	-0,0048	0,0072
Desvio padrão intercepto ^a	0,0747	0,0213	0,0345
Linearidade-coeficiente determinação (R ²) ^a	0,9943	0,9929	0,9946

(a) Curvas de calibração com correção da área com padrão interno. Curva analítica com sete níveis de concentração, cada ponto elaborado em triplicata e medido em triplicata.

Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram baixos valores de desvio padrão para a inclinação e intercepto, além de coeficientes de determinação da ordem de 0,99 sendo considerados adequados segundo a ANVISA (2016) e INMETRO (2003).

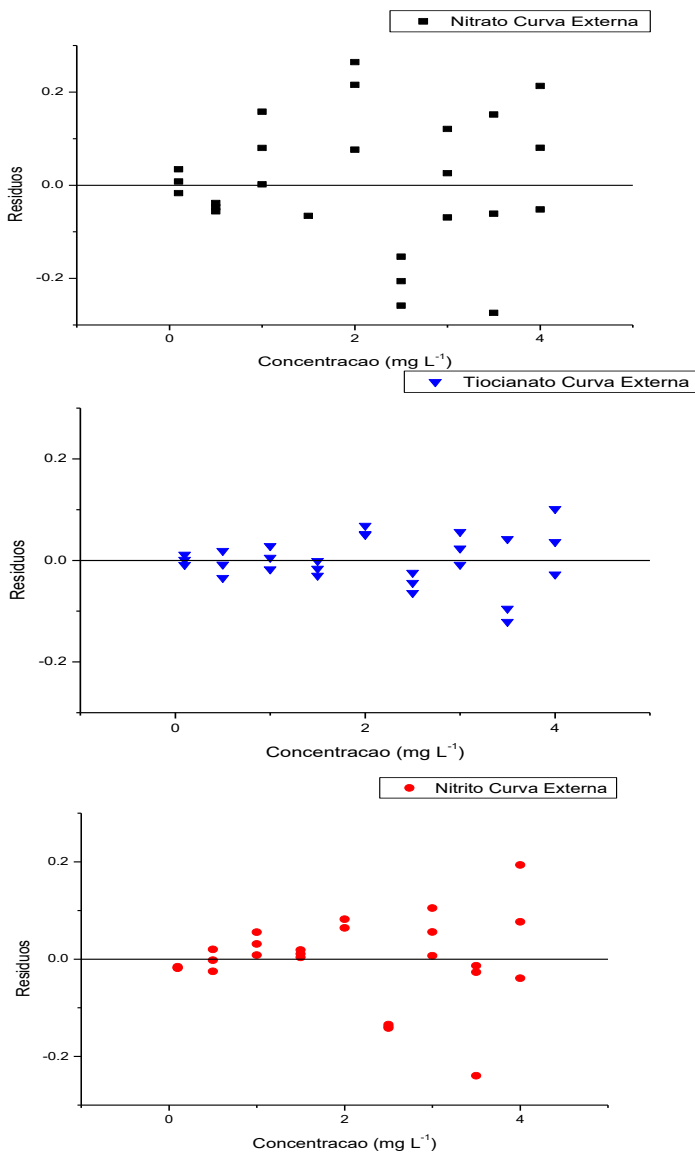
Os gráficos dos resíduos para as curvas em solução aquosa do método otimizado utilizando capilares de sílica não revestidos e revestidos com SAQQ estão apresentados nas Figuras 21 e 22.

Figura 21. Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva externa aquosa de nitrato, tiocianato e nitrito, utilizando capilar de sílica não revestido.



Fonte: Próprio autor.

Figura 22. Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva externa aquosa de nitrato, tiocianato e nitrito, utilizando capilar de sílica revestido com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).



Fonte: Próprio autor.

Os gráficos de resíduos mostram um padrão aleatório, indicando que as pressuposições de mínimos quadrados comuns estão sendo satisfeitas. Padrões não aleatórios podem violar esta pressuposição de que as variáveis preditoras não se relacionam com os resíduos. Além disto, realizou-se o teste de Grubbs onde não foi confirmada a presença de *outlier*.

Para verificar a distribuição normal dos dados foi realizado o teste de Shapiro-Wilk e os resultados do teste estão apresentados na Tabela 4. A distribuição normal dos dados foi confirmada pelo teste, sendo considerados normais devido W calculado ter sido maior que o W tabelado (valor crítico W $\alpha=5\%$). A homocedasticidade dos dados foi verificada pelo teste de Cochran e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 4. Valores obtidos no teste de Shapiro-Wilk pra verificar a distribuição normal da curva externa utilizando capilares não revestidos e revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).

Analito	W Calculado	n	W Tabelado	Resultado de Hipótese
Capilar não revestido				
NO_3^-	0,918	21	0,908	$W_{\text{cal}} > W_{\text{tab}}$, não rejeita H_0
SCN^-	0,922	21	0,908	$W_{\text{cal}} > W_{\text{tab}}$, não rejeita H_0
NO_2^-	0,914	21	0,908	$W_{\text{cal}} > W_{\text{tab}}$, não rejeita H_0
Capilar revestido com SAQQ				
NO_3^-	0,944	27	0,923	$W_{\text{cal}} > W_{\text{tab}}$, não rejeita H_0
SCN^-	0,941	27	0,923	$W_{\text{cal}} > W_{\text{tab}}$, não rejeita H_0
NO_2^-	0,945	27	0,923	$W_{\text{cal}} > W_{\text{tab}}$, não rejeita H_0

Hipóteses: H_0 = os dados provêm de uma distribuição normal; H_1 =Os dados não provêm de uma distribuição normal.

Tabela 5. Valores obtidos no teste de Cochran pra verificar a homocedasticidade da curva externa utilizando capilares não revestidos e revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).

Analito	Q Calculado	n	Q Tabelado	Resultado de Hipótese
Capilar não revestido				
NO_3^-	0,505	21	0,664	$Q_{\text{cal}} < Q_{\text{tab}}$, não rejeita H_0
SCN^-	0,639	21	0,664	$Q_{\text{cal}} < Q_{\text{tab}}$, não rejeita H_0
NO_2^-	0,618	21	0,664	$Q_{\text{cal}} < Q_{\text{tab}}$, não rejeita H_0
Capilar revestido com SAQQ				
NO_3^-	0,498	27	0,573	$Q_{\text{cal}} < Q_{\text{tab}}$, não rejeita H_0
SCN^-	0,511	27	0,573	$Q_{\text{cal}} < Q_{\text{tab}}$, não rejeita H_0
NO_2^-	0,483	27	0,573	$Q_{\text{cal}} < Q_{\text{tab}}$, não rejeita H_0

Hipóteses: H_0 = os dados são homocedásticos; H_1 =Os dados não são homocedásticos.

A homoscedasticidade foi confirmada pelo teste de Cochran, sendo homoscedásticos os dados quando o valor calculado for menor que o tabelado (valor crítico $Q \alpha=1\%$).

Confirma-se que a escolha do modelo MMQO é apropriada realizando o teste F para verificar a falta de ajuste ao modelo linear. Quando F calculado é maior que F tabelado (valor crítico $F \alpha=5\%$) o modelo não apresenta falta de ajuste. Conforme dados da Tabela 6 pode-se concluir que os modelos apresentados são lineares nas faixas de trabalho estudadas e não apresentam falta de ajuste ao modelo.

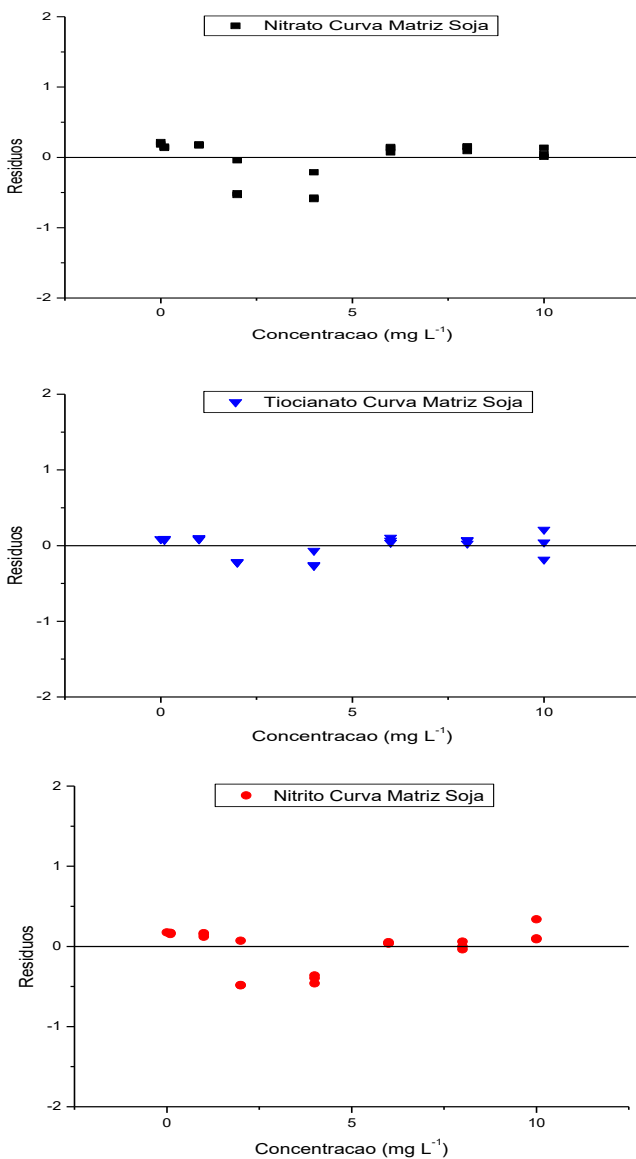
Tabela 6. Valores de F para verificação do ajuste ao modelo linear para curva externa utilizando capilares não revestidos e revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).

Analito	N	F Calculado	F Tabelado
Capilar não revestido			
NO_3^-	21	2.402,7	4,38
SCN^-	21	1.571,9	4,38
NO_2^-	21	4.757,4	4,38
Capilar revestido com SAQQ			
NO_3^-	27	3.127,5	4,24
SCN^-	27	4.917,6	4,24
NO_2^-	27	5.434,3	4,24

5.4.3 Efeito de matriz

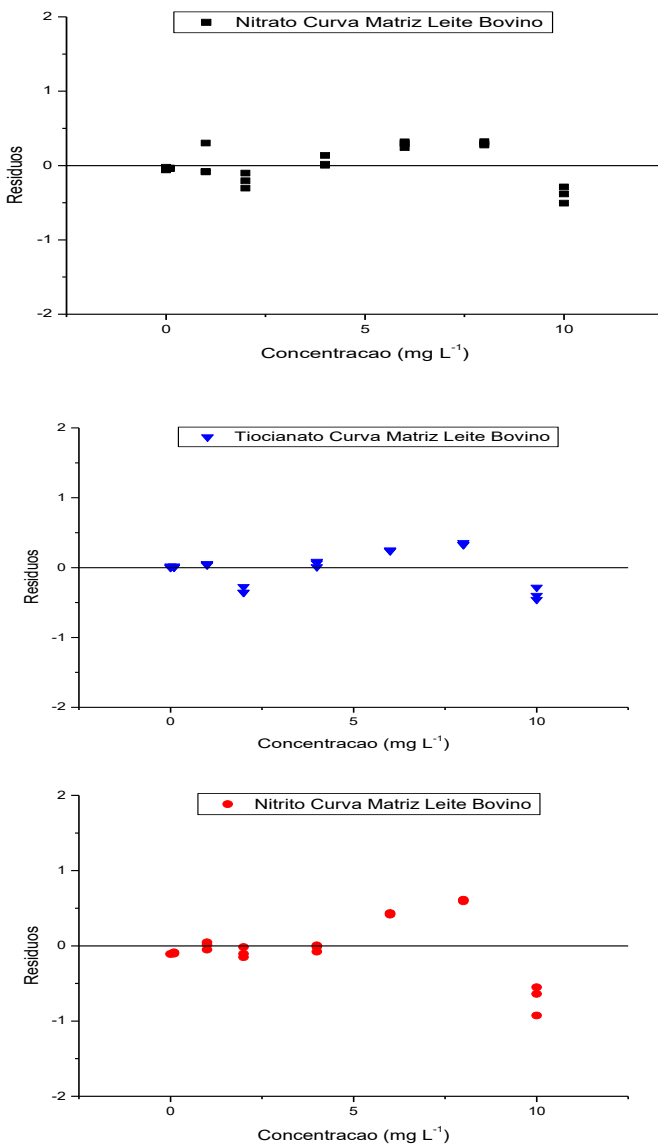
Para verificar o efeito de matriz no método proposto, os dados da curva de adição de padrão foram tratados de forma similar aos dados dos analitos em solução padrão, porém empregando as diferentes matrizes das amostras de interesse neste trabalho. As análises foram realizadas utilizando somente o capilar de sílica não revestido, pois se houver efeito de matriz o mesmo será identificado independente do capilar utilizado. Os gráficos dos resíduos para as três matrizes estão apresentados nas Figuras 23, 24 e 25.

Figura 23. Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva com adição de padrão na matriz de extrato hidrossolúvel de soja.



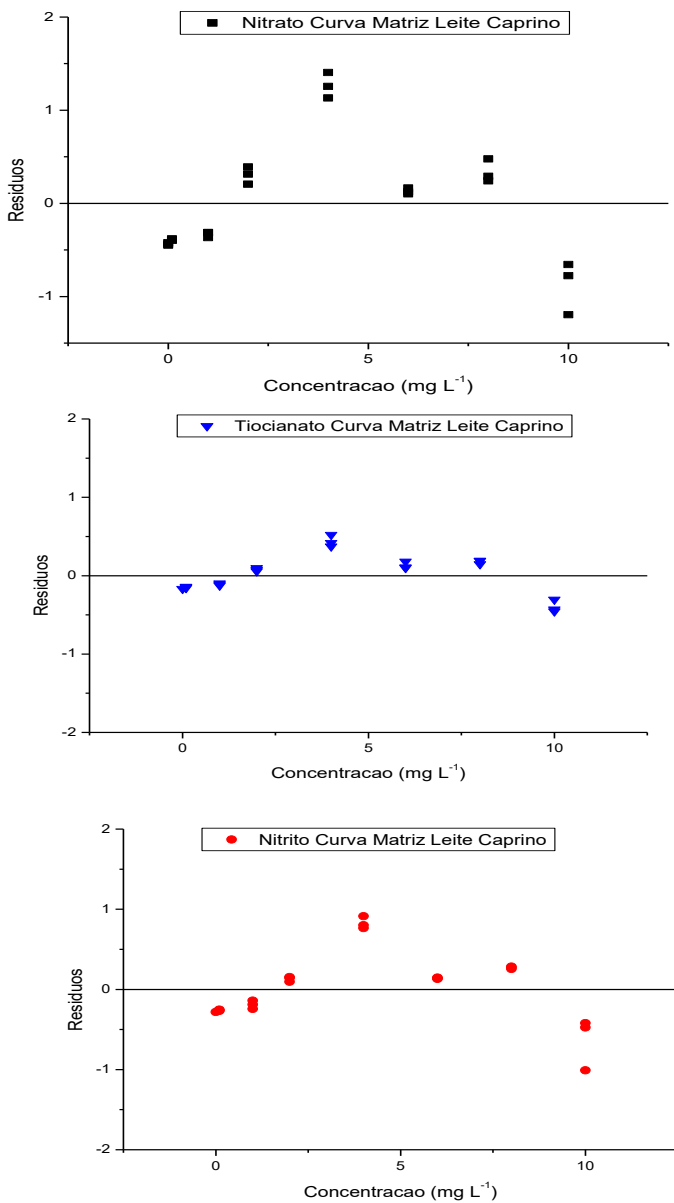
Fonte: Próprio autor.

Figura 24. Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva com adição de padrão na matriz de leite bovino.



Fonte: Próprio autor.

Figura 25. Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva com adição de padrão na matriz de leite caprino.



Fonte: Próprio autor.

Os gráficos de resíduos para as três matrizes mostraram um padrão aleatório, indicando que as pressuposições de mínimos quadrados comuns estão sendo satisfeitas. Além disso, realizou-se o teste de Grubbs onde não foi confirmada a presença de *outlier*.

Para verificar a distribuição normal dos dados foi realizado o teste de Shapiro-Wilk e os resultados do teste estão apresentados na Tabela 7. A distribuição normal dos dados foi confirmada pelo teste, sendo considerados normais devido W calculado ter sido maior que o W tabelado (valor crítico $W_{\alpha=5\%}$).

Tabela 7. Valores obtidos no teste de Shapiro-Wilk pra verificar a distribuição normal das curvas de adição de padrão em matriz.

Matriz	Analito	W Calculado	N	W Tabelado	Resultado de Hipótese
Bovino	NO ₃ ⁻	0,920	21	0,908	Wcal>Wtab, não rejeita HO
	SCN ⁻	0,917	21	0,908	Wcal>Wtab, não rejeita HO
	NO ₂ ⁻	0,923	21	0,908	Wcal>Wtab, não rejeita HO
Soja	NO ₃ ⁻	0,909	21	0,908	Wcal>Wtab, não rejeita HO
	SCN ⁻	0,916	21	0,908	Wcal>Wtab, não rejeita HO
	NO ₂ ⁻	0,920	21	0,908	Wcal>Wtab, não rejeita HO
Caprino	NO ₃ ⁻	0,923	21	0,908	Wcal>Wtab, não rejeita HO
	SCN ⁻	0,929	21	0,908	Wcal>Wtab, não rejeita HO
	NO ₂ ⁻	0,929	21	0,908	Wcal>Wtab, não rejeita HO

Hipóteses: Ho= os dados provêm de uma distribuição normal; H1=Os dados não provêm de uma distribuição normal.

A homocedasticidade dos dados foi verificada pelo teste de Cochran e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8. A homoscedasticidade foi confirmada pelo teste, sendo homoscedásticos os dados quando o valor calculado foi menor que o tabelado (valor crítico $Q_{\alpha=1\%}$).

Tabela 8. Valores obtidos no teste de Cochran pra verificar a homocedasticidade das curvas de adição de padrão em matriz.

Matriz	Analito	Q	n	Q	Resultado de Hipótese
		Calculado		Tabelado	
Bovino	NO ₃ ⁻	0,452	21	0,664	Qcal<Qtab, não rejeita HO
	SCN ⁻	0,524	21	0,664	Qcal<Qtab, não rejeita HO
	NO ₂ ⁻	0,510	21	0,664	Qcal<Qtab, não rejeita HO
Soja	NO ₃ ⁻	0,593	21	0,664	Qcal<Qtab, não rejeita HO
	SCN ⁻	0,581	21	0,664	Qcal<Qtab, não rejeita HO
	NO ₂ ⁻	0,454	21	0,664	Qcal<Qtab, não rejeita HO
Caprino	NO ₃ ⁻	0,460	21	0,664	Qcal<Qtab, não rejeita HO
	SCN ⁻	0,649	21	0,664	Qcal<Qtab, não rejeita HO
	NO ₂ ⁻	0,612	21	0,664	Qcal<Qtab, não rejeita HO

Hipóteses: Ho= os dados são homocedásticos; H1=Os dados não são homocedásticos.

De acordo com os resultados anteriores confirma-se que a escolha do modelo MMQO é apropriada. Por isso, foi realizado o teste *F* para verificar a falta de ajuste ao modelo linear, quando *F* calculado é maior que *F* tabelado (valor crítico *F* $\alpha=5\%$) o modelo não apresenta falta de ajuste. Conforme Tabela 9 pode-se concluir que o modelo apresentado é linear na faixa de trabalho estudada (0,1 – 10,0 mg L⁻¹).

Tabela 9. Valores de *F* para verificação do ajuste ao modelo linear para curva aquosa.

Matriz	Analito	n	<i>F</i> Calculado	<i>F</i>
				Tabelado
Bovino	NO ₃ ⁻	21	1621,3	4,38
	SCN ⁻	21	1125,2	4,38
	NO ₂ ⁻	21	2419,8	4,38
Soja	NO ₃ ⁻	21	5927,1	4,38
	SCN ⁻	21	4607,3	4,38
	NO ₂ ⁻	21	4083,6	4,38
Caprino	NO ₃ ⁻	21	635,4	4,38
	SCN ⁻	21	1499,5	4,38
	NO ₂ ⁻	21	1170,5	4,38

Para avaliação do efeito de matriz comparou-se a inclinação das curvas preparadas em solução padrão e na matriz. As curvas analíticas geradas através de regressão linear apresentaram os valores de inclinação descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de inclinação da curva analítica média gerada através de regressão linear para a curva externa e para a curva de adição em matriz de leite bovino, caprino e extrato hidrossolúvel de soja.

Análitos	Curva externa	Curva adição na matriz		
		Bovino	Caprino	Soja
NO ₃ ⁻	1,1672	1,0692	1,0936	1,2220
SCN ⁻	0,5667	0,4805	0,5628	0,5384
NO ₂ ⁻	1,0300	1,0373	1,0314	1,1143

Através dos valores de inclinações obtidos aplicou-se o teste *F* para verificar a homogeneidade das variâncias. Quando *F* calculado for maior que *F* tabelado, as variâncias são homogêneas, e então, aplica-se o teste *t-Student* para amostras com variâncias equivalentes. Caso contrário, pode se usar o teste *t-Student* para as variâncias distintas. O teste *F* está apresentado na Tabela 11 e o teste *t-Student* está apresentado na Tabela 12 considerando o valor crítico $t_{\alpha=5\%}$.

Tabela 11. Valores obtidos no teste *F* para comparação das inclinações das curvas em solução padrão e por adição de padrão na matriz.

Matriz	Análito	<i>F</i>	<i>F</i>	Resultado de Hipótese
		Calculado	Tabelado	
Bovino	NO ₃ ⁻	0,312	0,053	Fcal>Ftab, não rejeita HO
	SCN ⁻	0,449	0,053	Fcal>Ftab, não rejeita HO
	NO ₂ ⁻	0,686	0,053	Fcal>Ftab, não rejeita HO
Soja	NO ₃ ⁻	0,437	0,053	Fcal>Ftab, não rejeita HO
	SCN ⁻	0,599	0,053	Fcal>Ftab, não rejeita HO
	NO ₂ ⁻	0,175	0,053	Fcal>Ftab, não rejeita HO
Caprino	NO ₃ ⁻	0,298	0,053	Fcal>Ftab, não rejeita HO
	SCN ⁻	0,507	0,053	Fcal>Ftab, não rejeita HO
	NO ₂ ⁻	0,450	0,053	Fcal>Ftab, não rejeita HO

Hipóteses: Ho= Variâncias equivalentes; H1= Variâncias não equivalentes.

Tabela 12. Valores obtidos no teste de *t-Student* para os dados das curvas de adição de padrão em matriz.

Matriz	Analito	<i>t</i>	<i>t</i>	Resultado de Hipótese
		Calculado	Tabelado	
Bovino	NO ₃ ⁻	1,940	2,132	tcal<ttab, não rejeita HO
	SCN ⁻	1,304	2,132	tcal<ttab, não rejeita HO
	NO ₂ ⁻	-0,613	2,132	tcal<ttab, não rejeita HO
Soja	NO ₃ ⁻	-1,893	2,132	tcal<ttab, não rejeita HO
	SCN ⁻	-0,072	2,132	tcal<ttab, não rejeita HO
	NO ₂ ⁻	-2,853	2,132	tcal<ttab, não rejeita HO
Caprino	NO ₃ ⁻	1,070	2,132	tcal<ttab, não rejeita HO
	SCN ⁻	1,922	2,132	tcal<ttab, não rejeita HO
	NO ₂ ⁻	-0,634	2,132	tcal<ttab, não rejeita HO

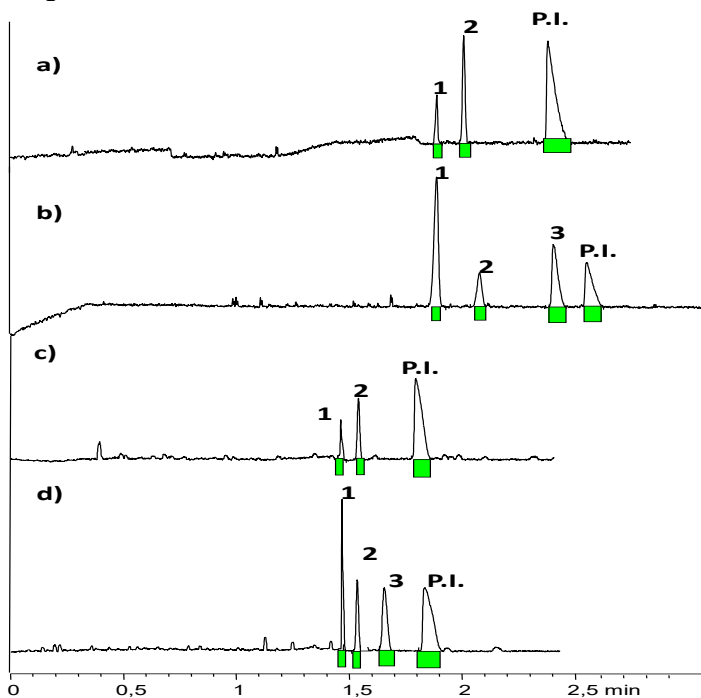
Hipóteses: Ho= Não há efeito de matriz; H1=Há efeito de matriz.

De acordo com os cálculos observou-se que *F* calculado foi maior que *F* tabelado em todos os casos indicando que as variâncias são homogêneas. A partir dos resultados do teste *t* verificou-se que as amostras de leite bovino, soja e caprino não possuem efeito de matriz devido valores de *t* calculado serem menores que *t* tabelado. Desta forma, as quantificações dos analitos nitrato, nitrito e tiocianato foram realizadas utilizando a curva de calibração com padronização externa.

5.4.4 Seletividade

Utilizando a ferramenta do software *HP ChemStation*[®] foi possível avaliar a pureza dos picos nos pontos da curva analítica e nas amostras analisadas. Quando não ocorre a sobreposição de picos através da absorção simultânea de compostos em uma mesma região do espectro ultravioleta, o software indica uma tarja verde abaixo dos picos analisados, em caso contrário a tarja se mostra vermelha. A ferramenta para verificação da pureza dos picos foi utilizada no método proposto aplicado ao capilar não revestido e no capilar revestido com SAQQ, conforme mostra a Figura 26. Os resultados indicaram que para todos os analitos foi confirmada a pureza de pico nas amostras estudadas pelo método proposto, o que é um indicativo de seletividade.

Figura 26. Eletroferograma da separação dos analitos com aplicação da ferramenta do software *HP ChemStation*[®] para verificação da pureza do pico. (a) Experimental amostra de leite bovino integral aplicada no capilar de sílica não revestido. (b) Experimental ponto 1mg L⁻¹ da curva de calibração externa aplicada no capilar de sílica não revestido. (c) Experimental amostra de leite bovino integral aplicada no capilar de sílica revestido com sal de quitosana quaternizada (SAQQ). (d) Experimental ponto 1 mg L da curva de calibração externa aplicada no capilar de sílica revestido com SAQQ. Condições de separação: 24 mmol L⁻¹ de ácido perclórico e 30 mmol L⁻¹ de ácido aminocaprílico, pH 3,84, injeção 50 mbar, 40 s, -30 kV, Capilar com 48,5 cm de comprimento total (40 cm efetivo× 75 µm diâmetro interno), detecção direta em 210 nm. Legenda: 1-Nitrato; 2-Tiocianato; 3- Nitrito; P.I.- Bromato.

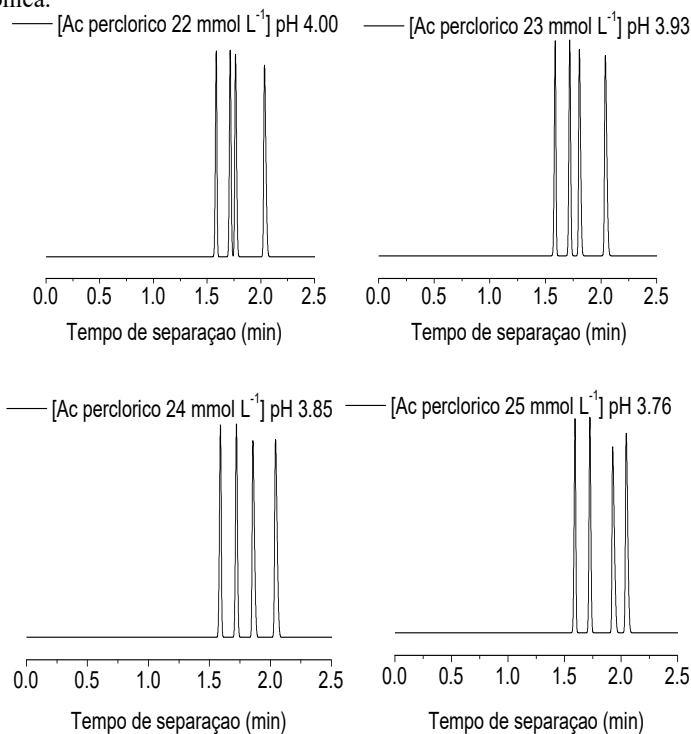


Fonte: Próprio autor.

Os analitos apresentam alta mobilidade e por isso migram de forma independente e rápida para o detector sendo detectados de forma direta, dessa forma livrando-se da matriz da amostra e seus componentes. Neste caso um dos fatores que poderiam comprometer a seletividade do método seriam os próprios analitos quando a separação não for efetiva. Para avaliar a possibilidade desta interferência foi utilizado o *PeakMaster*[®]. As Figuras 27 e 28 apresentam as simulações

através deste software para o capilar não revestido e as Figuras 29 e 30 apresentam as simulações para o capilar revestido com SAQQ. Através destas figuras é possível observar que pequenas alterações na composição do eletrólito comprometem a seletividade do método. Isto ocorre devido ao íon nitrito, pois em pH abaixo de 4 a mobilidade do nitrito é reduzida devido ao seu pKa ser igual a 3,22. Nesta condição o nitrito não estará completamente dissociado, desta forma pequenas variações de pH fazem com que o nitrito migre com menor ou maior mobilidade afetando a seletividade do método por co-migrar com tiocianato ou com bromato.

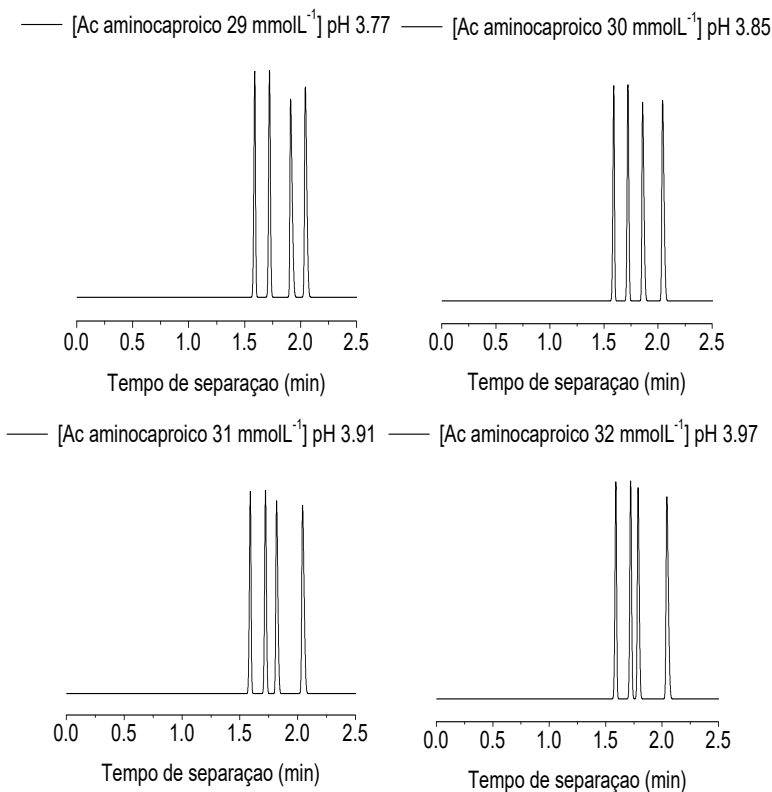
Figura 27. Eletroferogramas simulados no software *PeakMaster*[®] mantendo a concentração de ácido aminocaproico fixada em 30 mmol L⁻¹ e variando a concentração de ácido perclórico de 22 a 25 mmol L⁻¹ para separação dos analitos. Demais condições de separação: 30 kV, capilar não revestido com 48,5 cm de comprimento total (40 cm efetivo), detecção direta com correção da força iônica.



Fonte: Próprio autor.

De acordo com as simulações da Figura 27 utilizando o capilar não revestido, a concentração de ácido perclórico na composição do eletrólito pode sofrer variações de 23 a 25 mmol L^{-1} sem comprometer a seletividade do método, indicando uma variação possível de aproximadamente 0,2 unidades de pH.

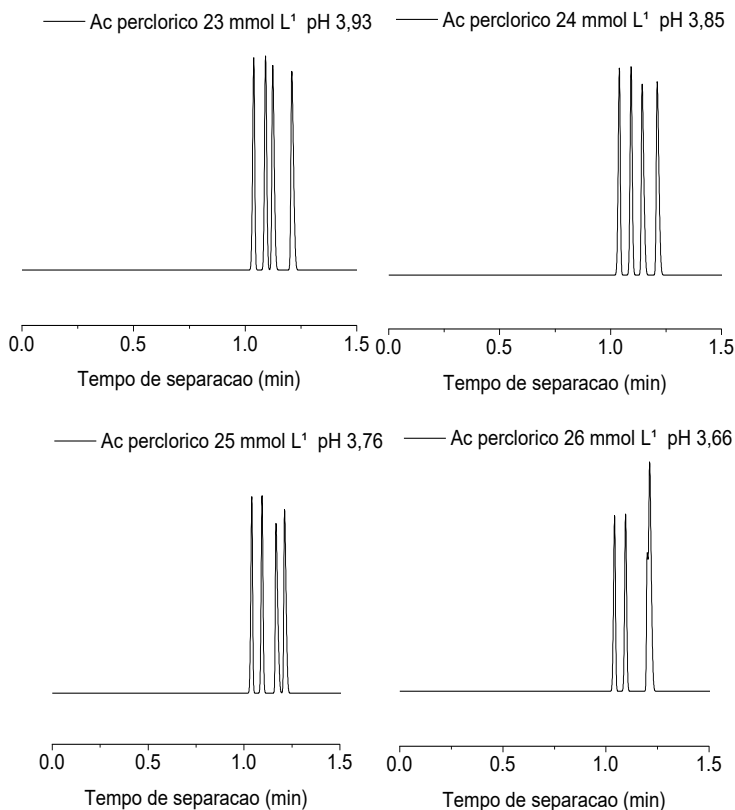
Figura 28. Eletroferogramas simulados no software *PeakMaster*[®] mantendo a concentração de ácido perclórico fixada em 24 mmol L^{-1} e variando a concentração de ácido aminocaproico de 29 a 32 mmol L^{-1} para separação dos analitos. Demais condições de separação: 30 kV, Capilar não revestido com 48,5 cm de comprimento total (40 cm efetivo), detecção direta com correção da força iônica.



Fonte: Próprio autor.

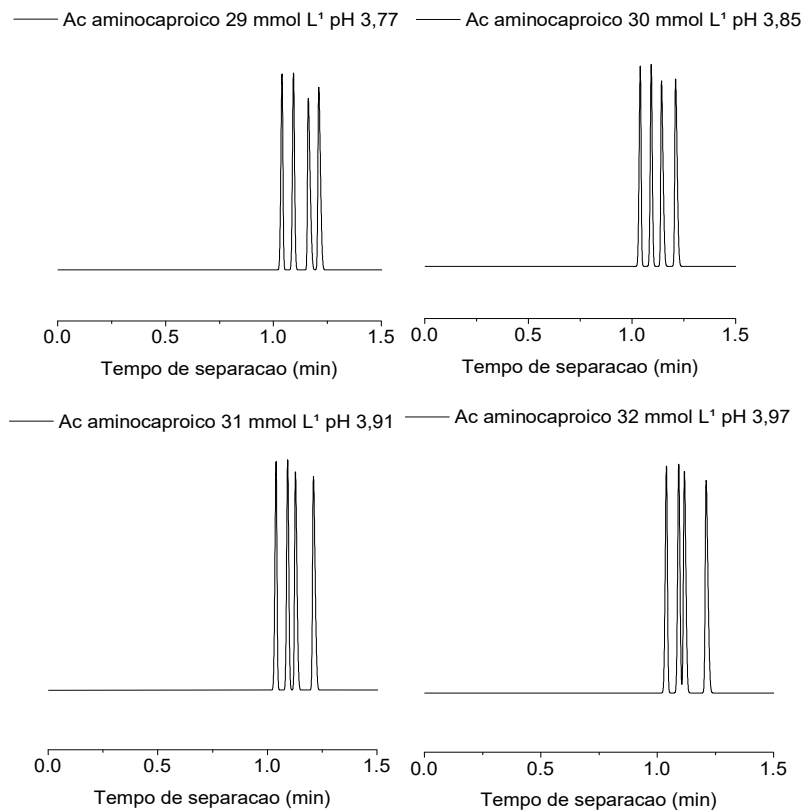
De acordo com as simulações da Figura 28 utilizando o capilar não revestido, a concentração de ácido aminocaproico na composição do eletrólito pode sofrer variações de 29 a 32 mmol L⁻¹ sem comprometer a seletividade do método, indicando uma variação possível de aproximadamente 0,3 unidades de pH.

Figura 29. Eletroferogramas simulados no software *PeakMaster*[®] mantendo a concentração de ácido aminocaproico fixada em 30 mmol L⁻¹ e variando a concentração de ácido perclórico de 23 a 26 mmol L⁻¹ para separação dos analitos. Demais condições de separação: 30 kV, simulação de capilar revestido com sal de quitosana quaternizada (Fluxo eletro-osmótico de 36×10^{-9} m²/Vs⁻¹) com 48,5 cm de comprimento total (40 cm efetivo), detecção direta com correção da força iônica.



Fonte: Próprio autor.

Figura 30. Eletroferogramas simulados no software *PeakMaster*[®] mantendo a concentração de ácido perclórico fixada em 24 mmol L^{-1} e variando a concentração de ácido aminocaproico de 29 a 32 mmol L^{-1} para separação dos analitos. Demais condições de separação: 30 kV, simulação de capilar revestido com sal de quitosana quaternizada (Fluxo eletro-osmótico de $36 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{Vs}^{-1}$) com 48,5 cm de comprimento total (40 cm efetivo), detecção direta com correção da força iônica.



Fonte: Próprio autor.

De acordo com as simulações das Figuras 29 e 30 utilizando o capilar revestido com SAQQ, variações na concentração de ácido perclórico ou de ácido aminocaproico na composição do eletrólito da ordem de 0,1 unidades de pH comprometem a resolução dos picos, dificultando a separação dos analitos de interesse.

5.4.5 Precisão

A precisão do método desenvolvido aplicado no capilar de sílica não revestido e revestido por SAQQ foi avaliada utilizando soluções padrão de nitrato, tiocianato e nitrito em três níveis de concentração. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores de precisão intra e inter-ensaio para o método desenvolvido aplicado no capilar de sílica não revestido, avaliado em três níveis de concentração utilizando soluções padrão de nitrato, tiocianato e nitrito.

Concentração (mg L ⁻¹)	Analito	Intra-ensaio*		Inter-ensaio**	
		(CV%)		(CV%)	
		Tempo migração	Área do pico	Tempo migração	Área do pico
Capilar não revestido					
0,1	NO ₃ ⁻	1,26	6,90	1,04	7,81
	SCN ⁻	1,19	9,77	1,00	11,13
	NO ₂ ⁻	1,40	11,49	0,78	4,61
2,0	NO ₃ ⁻	1,45	8,10	1,75	8,31
	SCN ⁻	1,29	7,26	1,60	3,56
	NO ₂ ⁻	1,42	8,43	1,23	2,30
8,0	NO ₃ ⁻	2,62	11,53	1,31	5,57
	SCN ⁻	2,36	11,71	1,26	4,71
	NO ₂ ⁻	2,43	9,12	1,02	2,62
Capilar revestido com SAQQ					
0,5	NO ₃ ⁻	3,59	3,71	10,95	6,52
	SCN ⁻	3,97	2,61	9,75	11,37
	NO ₂ ⁻	4,13	4,01	11,52	4,38
2,0	NO ₃ ⁻	2,61	4,11	9,18	3,42
	SCN ⁻	3,06	4,05	9,39	4,45
	NO ₂ ⁻	3,27	2,96	9,70	4,89
3,5	NO ₃ ⁻	3,15	4,68	6,03	8,32
	SCN ⁻	3,70	3,85	4,99	7,94
	NO ₂ ⁻	4,12	2,83	4,67	6,94

*n=10; **n=9

Os valores de CV da precisão intra-ensaio variaram de 1,19 a 11,71% e nos inter-ensaio variaram entre 0,78 a 11,13% aplicando o método desenvolvido no capilar de sílica não revestido. Aplicando o método no capilar de sílica revestido com SAQQ os valores de CV da precisão intra-ensaio variaram de 2,61 a 4,68% e nos inter-ensaio variaram entre 3,42 a 11,52%. Observou-se um maior CV no método aplicado no capilar revestido quando analisado o tempo de migração

para avaliação das precisões, porém o método apresentou menor CV quando analisada a área do pico em comparação com o método aplicado no capilar não revestido. Os resultados obtidos foram considerados adequados, pois segundo AOAC (2016), o coeficiente de variação está relacionado com o nível de concentração do analito na amostra. Desse modo, para níveis de concentração da ordem de mg L^{-1} considera-se adequados CV da ordem de até 11%.

5.4.6 Exatidão

Os resultados médios obtidos através da adição e recuperação de nitrato, tiocianato e nitrito em três níveis de concentração adicionados a três amostras de diferentes matrizes estão dispostos na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de recuperação de nitrato, tiocianato e nitrito avaliada em três níveis de concentração adicionados a três amostras com diferentes matrizes, utilizando capilares de sílica revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ) e não revestidos.

Concentração (mg L^{-1})	Matriz	Recuperação NO_3^- (%)	Recuperação SCN^- (%)	Recuperação NO_2^- (%)
Capilar não revestido				
0,1	Bovino	98,0±0,1	83,0±0,1	80,0±0,1
	Caprino	85,0±0,1	90,0±0,1	106,0±0,1
	Soja	105,4±0,1	102,0±0,1	91,1±0,1
2,0	Bovino	90,0±0,1	82,0±0,1	94,5±0,1
	Caprino	103,0±0,1	106,5±0,1	102,2±0,1
	Soja	85,0±0,2	86,7±0,2	85,1±0,3
8,0	Bovino	101,9±0,1	104,1±0,1	104,3±0,1
	Caprino	103,6±0,1	101,4±0,1	101,7±0,1
	Soja	99,5±0,1	101,5±0,4	101,4±0,1
Capilar revestido com SAQQ				
0,5	Bovino	82,4±0,8	97,6±0,7	96,4±1,7
	Caprino	94,2±0,1	98,5±0,1	91,8±0,1
	Soja	81,0±0,1	87,9±0,1	91,4±0,1
2,0	Bovino	90,5±0,4	100,3±0,1	100,8±0,2
	Caprino	100,2±0,1	98,9±0,1	98,7±0,1
	Soja	85,9±0,3	81,0±0,1	80,0±0,3
3,5	Bovino	103,9±0,9	102,5±0,4	104,5±0,9
	Caprino	101,7±0,1	100,7±0,1	100,8±0,1
	Soja	104,5±0,2	105,1±0,1	106,0±0,1

Para o método aplicado no capilar não revestido as recuperações na matriz de leite bovino para o nitrato variaram de 90 a 102%, para o tiocianato de 82 a 104% e para o nitrito de 80 a 104% nos níveis de concentração selecionados. Na matriz de leite caprino as recuperações para o nitrato variaram de 85 a 104%, para o tiocianato de 90 a 106% e para o nitrito de 102 a 106% nos níveis de concentração selecionados. Na matriz de leite de soja as recuperações para o nitrato variaram de 85 a 105%, para o tiocianato de 87 a 102% e para o nitrito de 85 a 101% nos níveis de concentração selecionados.

Para o método aplicado no capilar revestido com SAQQ as recuperações na matriz de leite bovino para o nitrato variaram de 82 a 104%, para o tiocianato de 99 a 102% e para o nitrito de 96 a 104% nos níveis de concentração selecionados. Na matriz de leite caprino as recuperações para o nitrato variaram de 94 a 102%, para o tiocianato de 98 a 101% e para o nitrito de 92 a 101% nos níveis de concentração selecionados. Na matriz de leite de soja as recuperações para o nitrato variaram de 81 a 104%, para o tiocianato de 81 a 105% e para o nitrito de 80 a 106% nos níveis de concentração selecionados.

A AOAC (2016) considera aceitável valores de recuperação entre 80 e 110% e para analitos presentes nas amostras em níveis de mg L^{-1} . Sendo assim, tanto no método aplicado ao capilar não revestido quanto no método aplicado ao capilar revestido todas as amostras apresentaram resultados de recuperação adequados.

Em um segundo momento com a finalidade de realizar um método comparativo para determinação de nitrito e nitrato, três amostras de extrato hidrossolúvel de soja foram analisadas através da aplicação do método de referência da IN nº68 de 12 de dezembro de 2006 do MAPA (ANEXO A). Os parâmetros da curva analítica para determinação de nitrito e nitrato, através de nitrito total por espectrofotometria de UV-Visível estão apresentados no ANEXO B. Posteriormente as mesmas amostras foram analisadas através do método desenvolvido no presente estudo. Em ambos os métodos as análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Resultados da comparação entre ensaios realizados através do método desenvolvido por eletroforese capilar de zona proposto no presente trabalho e o método de referência da IN nº68/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para quantificação de nitrato e nitrito em amostras de extrato hidrossolúvel de soja.

AMOSTRA	Concentração (mg L ⁻¹)				Erro relativo (%) ^f
	Método proposto por CZE		Método de referência IN nº68/2006 MAPA		
	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	
A	6,50±0,12	<LD ^a	6,30±0,21	<LQ ^b	3,17
B	6,10±0,10	<LD ^a	6,20±0,10	<LQ ^b	1,61
C	10,00±0,04	<LD ^a	9,20±0,15	<LQ ^b	8,70

a) LD de 0,01 mg L⁻¹ para o método desenvolvido por CZE.

b) LQ de 1,50 mg L⁻¹ para o Método de referência IN nº68/2006 MAPA.

c) Erro relativo = $\left| \frac{\text{Método referência} - \text{método desenvolvido}}{\text{Método referência}} \right| \times 100$

Os resultados obtidos na comparação entre os métodos indicaram um erro relativo menor que 9% para as medidas realizadas, o que indica uma boa exatidão do método proposto. Aplicou-se ainda o teste F nos resultados obtidos para verificar a homogeneidade das variâncias. Quando F calculado for maior que F tabelado, as variâncias são homogêneas, e então, aplica-se o teste *t-Student* para amostras com variâncias equivalentes. Caso contrário, pode se usar o teste *t-Student* para as variâncias distintas. O teste F está apresentado na Tabela 16 e o teste *t-Student* está apresentado na Tabela 17 considerando o valor crítico $t_{\alpha=5\%}$.

Tabela 16. Valores obtidos no teste F para comparação do método por eletroforese capilar em zona proposto neste estudo e o método de referência da IN nº68/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para quantificação de nitrato e nitrito em amostras de extrato hidrossolúvel de soja.

Amostra	F Calculado	F Tabelado	Resultado de Hipótese
A	0,242	0,053	Fcal>Ftab, não rejeita HO
B	0,491	0,053	Fcal>Ftab, não rejeita HO
C	0,070	0,053	Fcal>Ftab, não rejeita HO

Hipóteses: Ho= Variâncias equivalentes; H1= Variâncias não equivalentes.

Tabela 17. Valores obtidos no teste de t-Student para comparação do método por eletroforese capilar em zona proposto neste estudo e o método de referência da IN nº68/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para quantificação de nitrato e nitrito em amostras de extrato hidrossolúvel de soja.

Amostra	<i>t</i>		Resultado de Hipótese
	Calculado	Tabelado	
A	0,305	2,132	tcal<ttab, não rejeita HO
B	-2,054	2,132	tcal<ttab, não rejeita HO
C	9,487	2,132	tcal>ttab, rejeita HO

Hipóteses: Ho= Não há diferenças significativas; H1=Há diferenças significativas.

De acordo com os cálculos observou-se que *F* calculado foi maior que *F* tabelado em todos os casos indicando que as variâncias são homogêneas. A partir dos resultados do teste *t* verificou-se que para as amostras A e B não houve diferenças significativas entre a aplicação do método proposto e o método de referência, devido aos valores de *t* calculados serem menores que *t* tabelado. Já na amostra C houve diferença significativa devido ao valor de *t* calculado ser maior que *t* tabelado. Não foi possível realizar o teste comparativo em outras matrizes de leite, pois a concentração de nitrato e nitrito nas amostras de leite bovino e caprino estavam abaixo do limite de quantificação do método de referência.

5.4.7 Limites de detecção e quantificação

Os resultados obtidos para o LD e LQ através da razão sinal/ruído e dos parâmetros da curva analítica estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Comparação dos valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) obtidos através da relação sinal/ruído e dos parâmetros da curva analítica utilizando capilares não revestidos e revestidos com sal de quitosana quaternizada (SAQQ).

Analito	Razão sinal/ruído (mg L ⁻¹)		Parâmetros da curva de calibração (mg L ⁻¹)	
	LD	LQ	LD	LQ
Capilar não revestido				
NO ₃ ⁻	0,01	0,03	0,14	0,43
SCN ⁻	0,01	0,04	0,27	0,81
NO ₂ ⁻	0,01	0,05	0,28	0,86
Capilar revestido com SAQQ				
NO ₃ ⁻	0,03	0,05	0,20	0,63
SCN ⁻	0,04	0,06	0,12	0,35
NO ₂ ⁻	0,04	0,07	0,14	0,44

Observam-se através da Tabela 18 que os valores de LD e LQ obtidos através dos parâmetros da curva analíticas são maiores que os valores encontrados através da razão sinal/ruído. Levando em consideração a sensibilidade da técnica de CE optou-se por manter os limites obtidos através da razão sinal ruído. Já os valores de LD e LQ maiores para o método aplicado no capilar revestido se justifica devido ao aumento do ruído provocado pelo revestimento interno ao capilar.

5.5 DETERMINAÇÃO DE NITRATO, NITRITO E TIOCIANATO NAS AMOSTRAS DE LEITE E EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA

Após o processo de validação analítica constatou-se que o método proposto pode ser aplicado tanto no capilar de sílica não revestido quanto no capilar revestido com SAQQ sem prejuízo aos parâmetros de validação. Porém o capilar revestido com SAQQ apresentou algumas vantagens para a determinação dos analitos de interesse devido à presença da modificação. Dentre estas podemos citar a diminuição no tempo de análise, pois o revestimento de SAQQ inverte o fluxo (EOF anódico) o que torna as separações de ânions mais rápidas, aumentando a frequência analítica do método. Além disso, foram observados menores valores de CV para área de pico, pois a presença da modificação no capilar de sílica auxilia no controle do EOF, tornando-o estável e consequentemente melhorando a reprodutibilidade do método. Outra vantagem do revestimento é a diminuição das interações que a sílica do capilar não revestido pode sofrer com substâncias presentes na matriz das amostras como, por exemplo, proteínas, as quais podem ser adsorvidas na superfície do capilar alterando as características do fluxo durante as separações. Uma desvantagem encontrada seria a diminuição da faixa linear do método, devido ao surgimento de um EOF anódico os analitos migram muito rapidamente o que diminui a capacidade de injeção de amostras concentradas afetando a resolução dos picos. Porém, considerando que as amostras de leite e extrato hidrossolúvel de soja frequentemente não apresentam teores dos analitos maiores que a faixa linear escolhida ($0,1-4,0 \text{ mg L}^{-1}$) o método não será afetado por esta limitação da faixa linear. Caso haja algum problema de excesso dos analitos em decorrência de processos da indústria, as amostras podem ser diluídas e posteriormente o método seria aplicado sem maiores problemas.

Neste sentido selecionou-se o capilar revestido com SAQQ para aplicação do método proposto em nove amostras de leite e três amostras de extrato hidrossolúvel de soja comercializadas no mercado local (Florianópolis/SC). Os resultados das análises das amostras de leite bovino, caprino e do extrato hidrossolúvel de soja são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Resultados da quantificação de nitrato, tiocianato e nitrito para amostras de leite bovino, caprino e do extrato hidrossolúvel de soja pelo método proposto por eletroforese capilar de zona.

Amostra	Concentração (mg L ⁻¹)		
	NO ₃ ⁻	SCN ⁻	NO ₂ ⁻
A ⁽¹⁾	0,65±0,15	5,82±0,05	<LD*
B ⁽¹⁾	0,32±0,12	5,34±0,16	<LD*
C ⁽¹⁾	0,35±0,02	6,51±0,17	<LD*
D ⁽¹⁾	0,31±0,06	5,17±0,05	<LD*
E ⁽²⁾	0,39±0,13	6,73±0,05	<LD*
F ⁽²⁾	0,29±0,07	5,64±0,09	<LD*
G ⁽³⁾	0,63±0,15	<LD*	<LD*
H ⁽³⁾	0,25±0,04	<LD*	<LD*
I ⁽³⁾	0,31±0,05	<LD*	<LD*
J ⁽⁴⁾	6,35±0,09	<LD*	<LD*
L ⁽⁴⁾	7,12±0,11	<LD*	<LD*
M ⁽⁴⁾	9,32±0,07	<LD*	<LD*

(1) Amostras A, B, C e D correspondem a leite bovino integral UHT.

(2) Amostras E e F correspondem a leite bovino desnatado UHT.

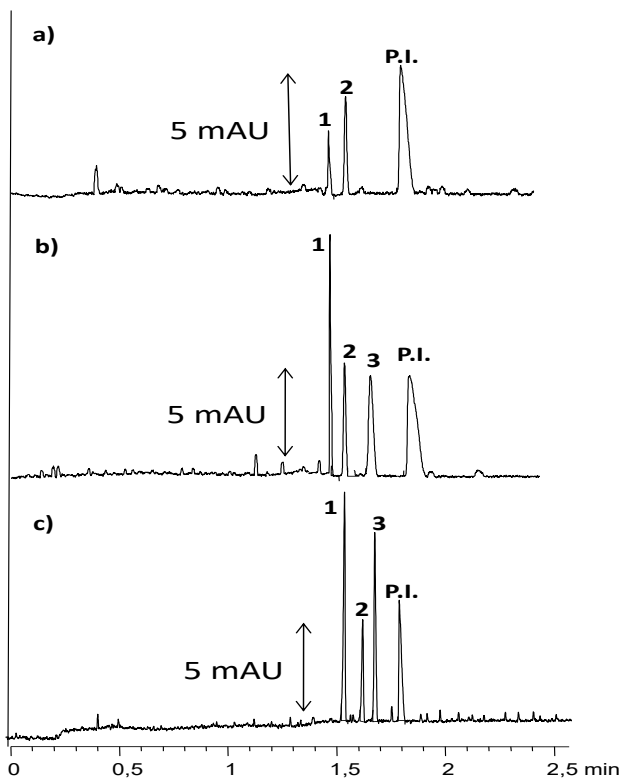
(3) Amostras G, H e I correspondem a leite caprino integral UHT.

(4) Amostras J, L e M correspondem ao extrato hidrossolúvel de soja.

*LD = 0,04 mg L⁻¹.

Os eletroferogramas das amostras de leite caprino, bovino e extrato hidrossolúvel de soja foram similares aos eletroferogramas obtidos para os padrões em solução aquosa, conforme mostra a Figura 31. Todas as amostras analisadas apresentaram concentração de nitrito inferior ao limite de quantificação do método. Amostras de leite caprino e da bebida a base de soja apresentaram concentração de tiocianato inferior ao limite de quantificação do método. Somente as amostras de leite bovino apresentaram teores de tiocianato quantificáveis. Quanto ao teor de nitrato todas as amostras apresentaram quantidades quantificáveis pelo método desenvolvido.

Figura 31. Eletroferogramas obtidos empregando o método otimizado a) amostra de leite bovino b) amostra de leite bovino com adição de soluções padrões e c) soluções padrões em água. Condições de injeção: eletrólito ácido aminocapróico 30 mmol L⁻¹ /ácido perclórico 24 mol L⁻¹, 50 mbar por 40s; tensão -30kV; tempo de condicionamento entre corridas com eletrólito 1 min. Capilar revestido com sal de quitosana quaternizada (SAQQ) com comprimento total de 48,5 cm, efetivo de 40 cm e diâmetro interno de 75 µm. Dados adquiridos do comprimento de onda 210 nm. Legenda dos picos: 1 - Nitrato; 2 – Tiocianato; 3- Nitrito; P.I. - Bromato.



Fonte: Próprio autor.

No Brasil, segundo o MAPA através da Instrução Normativa (IN) nº62/2011, não é permitida a utilização de aditivos e coadjuvantes de tecnologia/elaboração na produção de leite bovino pasteurizado e cru (BRASIL, 2011). O MAPA estabelece regulamentos técnicos e de identidade e qualidade do leite ultra alta temperatura (UHT) através da Portaria nº146/1996 e do leite de caprino através da IN nº37/2000.

Nestas nada consta a respeito da adição de aditivos, porém considera-se fraudado o leite que sofra adição, subtração ou substituição de quaisquer componentes naturais ou estranhos à composição normal do leite, sem a devida aprovação prévia do Serviço de Inspeção Federal e declaração na rotulagem (BRASIL, 1996; BRASIL, 2000). Considerando que o nitrato e o nitrito estão naturalmente presente na água e no solo, e que mamíferos podem absorver estes compostos e excretá-los no leite, seria bastante improvável não detectar nitrato e/ou nitrito no leite empregando um método de análise sensível (SANTOS et al, 2005).

O RIISPOA não especifica um teor máximo de tiocianato no leite bovino e caprino, porém segundo este regulamento considera-se fraudado, adulterado ou falsificado o leite que for adicionado de substâncias conservadoras ou de quaisquer elementos estranhos à sua composição (BRASIL, 2012). Desta forma entende-se que apesar de estudos mostrarem a eficiência da conservabilidade do leite cru a 20°C pela ativação da lactoperoxidase e adição de tiocianato de sódio, não há uma regulamentação que normatize a utilização deste processo no Brasil (KROLOW e FAGUNDES, 1996). Neste sentido acredita-se que as concentrações de tiocianato encontradas nas amostras de leite bovino são reflexos das concentrações sanguíneas do animal, as quais variam de acordo com a raça, regime de alimentação, saúde do úbere, fatores fisiológicos e tipos de alimentos (WOLFSON e SUMNER, 1993).

A ANVISA através da Resolução RDC nº 91 de 18 de outubro de 2000, aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos com soja. Esta resolução não especifica uma quantidade limite, nem veta a presença de nitrato, tiocianato e nitrito, porém consta que os produtos a base de soja devem obedecer a Legislação específica quanto à presença de aditivos alimentares, contaminantes e coadjuvantes da tecnologia de fabricação. O Conselho Nacional de Saúde através da Resolução nº 04 de 24 de novembro de 1988, estabelece um limite máximo para adição de aditivos intencionais em alimentos. Através desta, pode-se verificar que nitrito e nitrato podem ser adicionados como aditivos somente em produtos cárneos curados (exceto charque) e queijos (exceto minas frescal) (BRASIL, 2000; BRASIL, 1988). Desta forma, pode-se relacionar a presença de nitrato em bebidas a base de soja devido à utilização de fertilizantes e produtos agrícolas com a presença de grupos nitrogenados para a produção da soja em larga escala (LEVALLOIS e PHANEUF, 1994; RATH, XIMENES e REYES, 1994).

5.6 COMPARAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO PROPOSTO E OUTROS DESCRITOS NA LITERATURA

Segundo PÉREZ-OLMOS e colaboradores (1997), nitrato pode ser determinado em produtos cárneos através da potenciometria com a utilização de eletrodos seletivos. SANTOS e colaboradores, (2009) determinou nitrito em amostras de salsichas e vegetais em conserva por voltametria diferencial de pulso utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado. Segundo YONG et al. (2017) a concentração de tiocianato pode ser determinada em leite bovino através da técnica de cromatografia iônica com um detector de condutividade ou UV-Visível. De acordo com MERUSI et al. (2010) nitrato e nitrito podem ser determinados em vegetais utilizando CE com EOF invertido. Segundo DELLA BETTA e colaboradores nitrato e nitrito podem ser determinados em comida de bebê e produtos cárneos utilizando CZE com detecção direta no UV (DELLA BETTA et al., 2014; DELLA BETTA et al., 2016). O método desenvolvido por BJERGEGAARD e colaboradores (1995) utiliza MEKC para determinação simultânea de tiocianato, iodeto, nitrato e nitrito em amostras biológicas, como leite e sangue. O método desenvolvido no presente estudo e aplicado em um capilar de sílica revestido com SAQQ foi capaz de separar simultaneamente os ânions nitrato, nitrito e tiocianato em um tempo total de 5 minutos, envolvendo o preparo de amostra. Este tempo é muito menor do que os tempos descritos nos métodos da literatura. A Tabela 20 apresenta algumas características analíticas do método proposto e outras técnicas descritas na literatura empregadas para análise de alimentos.

De acordo com os métodos descritos na literatura para determinação de nitrato, nitrito e tiocianato, o método desenvolvido foi capaz de determinar simultaneamente e em menor tempo de análise os íons de interesse, através de um simples e rápido preparo de amostra. Observaram-se ainda no método proposto um dos menores valores de LD e LQ para os analitos de interesse. Neste sentido dentre as técnicas analíticas modernas a CE tem se destacado nas últimas décadas, pois apresenta potencial para fornecer separações com elevada eficiência, boa resolução, tempos de análise apreciavelmente curtos, total automatização, baixo custo operacional e reduzida geração de resíduos (TAVARES, 1996).

Tabela 20. Comparação de características analíticas do método proposto por CZE e outros métodos descritos na literatura empregados para análise de alimentos.

Técnica	Analito	Faixa linear (mg L ⁻¹)	Amostra	Preparo da amostra	Tempo de análise (min)	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	CV (%)	Recuperação (%)
Potenciometria (PÉREZ-OLMOS et al., 1997)	NO ₃ ⁻	50 – 200	Produtos cárneos	Extração ácida a quente e precipitação	30	23,2	NI*	0,84	101
Voltametria de pulso diferencial (SANTOS et al., 2009)	NO ₂ ⁻	0,023 - 0,345	Salsicha e vegetais	Extração a quente e precipitação	NI*	0,004	NI*	1,3	NI*
Cromatografia iônica (YONG et al., 2017)	SCN ⁻	NI*	Leite bovino	Precipitação e desengorduramento	NI*	0,1	NI*	NI*	NI*
CE (MERUSI et al., 2010)	NO ₃ ⁻ NO ₂ ⁻	0,5 - 100 1,6 – 160	Vegetais	Secagem e extração	17	0,3 0,8	0,5 1,6	4	90 – 109
CE (DELLA BETTA et al., 2014)	NO ₃ ⁻ NO ₂	5,0-55,0	Comida de bebê	Extração a quente e precipitação	12	0,09 0,15	0,30 0,49	0,89- 6,95	70 – 109
CE (DELLA BETTA et al., 2016)	NO ₃ ⁻ NO ₂	1,0 – 12,0 0,5 – 6,0	Produtos carneos	Extração a quente e filtração	2,35	0,10 0,31	0,31 1,25	0,08- 5,29	83 – 107
MEKC (BJERGEGAARD et al., 1995)	SCN ⁻ I ⁻ NO ₃ ⁻ NO ₂ ⁻	NI*	Leite	Troca iônica e secagem	15	0,48 0,14 3,1 0,69	NI*	2,37	NI*
Método proposto CZE	SCN ⁻ NO ₃ ⁻ NO ₂ ⁻	0,1 - 4,0	Leite e extrato soja	Precipitação	5	0,03 0,04 0,04	0,05 0,07 0,06	2,61 a 11,5	80 – 106

*NI = Não informado

6 CONCLUSÃO

A utilização do *software PeakMaster®*, permitiu desenvolver um método de separação cujos resultados experimentais mostraram-se muito próximos aos simulados. O padrão interno bromato também selecionado através desse *software*, permitiu a correção da área dos analitos, mostrando-se eficiente no seu propósito. O método desenvolvido foi aplicado em capilares de sílica não revestidos e revestidos com SAQQ.

A injeção de amostra por 40 segundos permitiu aumentar o sinal obtido e conseqüentemente realizar uma pré-concentração dos analitos, representando uma ocupação de 20% do capilar utilizado.

A avaliação da durabilidade do BGE ao longo de corridas consecutivas permitiu verificar alterações significativas no perfil de separação, deslocando o conjunto dos picos para tempos maiores, desta forma optou-se pela troca do BGE a cada cinco corridas consecutivas.

O estudo da estabilidade do revestimento de SAQQ no capilar de sílica mostrou a necessidade de reconstrução do revestimento a cada 35 corridas consecutivas. Os valores de mobilidade médios do EOF determinados foram $-31 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CV = 7,0%).

O método desenvolvido foi validado utilizando capilares de sílica não revestidos e revestidos com SAQQ, demonstrando resultados adequados segundo os protocolos de validação de métodos analíticos utilizados, entre eles o INMETRO, ANVISA e AOAC.

A utilização de capilares revestidos com SAQQ apresentou menor tempo de análise e CV quando comparado à utilização de capilares não revestidos. Desta forma, o uso de capilares revestidos foi selecionado para quantificação em amostras de leite bovino, caprino e extrato hidrossolúvel de soja. O método foi capaz de separar os analitos em um tempo aproximado de 2,0 minutos, associado a um simples preparo da amostra. Apresentando-se com potencial para ser empregado como alternativo ao método da IN°68/2006 do MAPA para análises de nitrato e nitrito em amostras de leite. O método também foi capaz de quantificar tiocianato apresentando potencial para ser aplicado como metodologia oficial uma vez que a instrução normativa do MAPA não especifica uma metodologia para determinação deste analito em amostras de leite.

De acordo com os métodos descritos na literatura para determinação de nitrato, nitrito e tiocianato, o método desenvolvido foi capaz de determinar simultaneamente e em menor tempo de análise os íons de interesse. Através de um simples e rápido preparo de amostra, foi possível realizar análises em uma amostra considerada de matriz complexa devido aos vários interferentes em sua composição. O método desenvolvido

mostrou menor consumo de reagentes e conseqüentemente uma menor quantidade de resíduos gerados quando comparados aos outros métodos descritos na literatura. Observaram-se ainda no método proposto um dos menores valores de LD e LQ para os analitos de interesse. Além disto, os parâmetros analíticos do método desenvolvido foram validados e são adequados segundo AOAC (2016).

7 REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração, 2ª edição, Rio de Janeiro, 2005.

AHMED, M. J. et al. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow-injection analysis. **Talanta**, Ioannina, v.43, p.1009-1018, 1996.

AL-ASSAF, A. H et al. Mechanism of cadmium induced apoptosis in human peripheral blood lymphocytes: The role of p53, Fas and Caspase-3. **Environmental toxicology and pharmacology**, Riyadh, v.36, p.1033–1039, 2013.

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

AOAC, Method 933.03, **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, 2005.

AOAC. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, 2016.

AUNE, T.M.; THOMAS, E.L. Accumulation of hypothiocyanate ion during peroxidase catalyzed oxidation of thiocyanate ion. **Infection Immunity**. v.20(2), p.456–463, 1978.

BJERGEGAARD, C.; MOLLER, P.; SORENSEN, H. Determination of thiocyanate, iodide, nitrate and nitrite in biological samples by micella electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.717, p.409-414, 1995.

BOER, I. J. M. Environmental impact assessment of conventional and organic milk production. **Livestock Production Science**, v. 80, p. 69-77, 2003.

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.. Análise enantiosseletiva de fármacos: Contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, 28, 4, 683-691, 2005.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimento Com Soja. **Resolução RDC nº 91**, de 18 de outubro de 2000.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução nº 899**, de 29 de maio de 2003.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Referente a Aditivos Intencionais. **RESOLUÇÃO CNS/MS N.º 04**, DE 24 DE NOVEMBRO DE 1988.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Guia de validação e controle de qualidade analítica. Secretaria de Defesa Agropecuária - Coordenação Geral de Apoio Laboratorial**, 1ª edição, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite UHT. **Portaria nº146** de 07 de março de 1996.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra. **Instrução Normativa nº37** de 31 de outubro de 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Aprova o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite bovino cru e pasteurizado. Seção 1, 24p. **Instrução Normativa nº62** de 29 de dezembro de 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Estabelece os métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Instrução Normativa nº 68** de 12 de dezembro de 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. R.I.I.S.P.O.A. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília, p.14, 2012.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimica Acta**, Kantvik, v. 128, n.1-2, p. 93-106, 1998.

BRUNING-FANN, C.S.; KANEENE, J.B. The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. **Veterinary and Human Toxicology**, v.35, n.3, p.237-253, 1993.

BUSSAB, W. D. O.; MORETTIN, P. A. Estatística básica. 6ª Edição, São Paulo: **Saraiva**, p. 540, 2010.

CASÉ, F. et al. Produção de ‘leite’ de soja enriquecido com cálcio. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.25(1), p.86-91, 2005.

CIFUENTES, A. et all. Treatments of fused-silica capillaries and their influence on the electrophoretic characteristics of these columns before and after coating. **Journal of Chromatography A**, v.823, p.561-571, 1998.

COCHRAN, W. G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. **Annals of Eugenics**, v. 11, p.47-52, 1941.

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

DELLA BETTA, F. et al. Development and validation of a sub-minute capillary zone electrophoresis method for determination of nitrate and nitrite in baby foods. **Talanta**, n.122, p. 23–29, 2014.

DELLA BETTA, F. et al. A sub-minute CZE method to determine nitrate and nitrite in meat products: An alternative for routine analysis. **Meat Science**, n. 119, p.62-68, 2016.

DOHAN, O.; DE LA VIEJA, A.; CARRASCO, N. Molecular study of the sodium-iodide symporter (NIS): A new field in thyroidology. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, n.11, p.99–105, 2000.

DOHERTY, E. A. S.; MEAGHER, R. J.; ALBARGHOUTH, M. N.; BARRON, A. E. Microchannel wall coatings for protein separations by capillary and chip electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, p. 34-54, 2003.

DRUNKLER, D.A.; FARINA, L.O.; NETO, G.K.. Alergia ao leite da vaca e possíveis substitutos dietéticos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 374, p. 3-16, 2010.

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

FAN, A.M., WILHITE, C.C., BOOK, S.A. Evaluation of the nitrate drinking water standard with reference to infant methemoglobinemia and potential reproductive toxicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.7, p. 135-148, 1987.

FAO/WHO. Benefits and potential risks of the lactoperoxidase system of raw milk preservation, **Report of an FAO/WHO technical meeting . Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Italy, Dezembro, 2005.

FAO/WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants: Thirty-fifth. **Report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. World Health Organization technical**. Report series; 789, Geneva, 1990.

FARACO, Rafael. Sobe para 19 o número de crianças intoxicadas com leite contaminado. **G1**, Santa Catarina, 29 set. 2012. Disponível em: <<http://g1.globo.com/sc/santa-catarina/noticia/2012/09/sobe-para-19-o-numero-de-criancasintoxicadas-com-leite-contaminado.html>>. Acesso em: 12 jan.2017.

FU, X. et al. Analysis of natural carbohydrate biopolymer-high molecular chitosan and carboxymethyl chitosan by capillary zone electrophoresis. **Carbohydrate Polymers**, v.68, p. 511-516, 2007.

GARCIA, C.A. et al. Influência do ozônio sobre a microbiota do leite ‘in natura’. São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, v.14, n. 70, p.36-50, 2000.

GAS, B. et al. Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis: I. Mathematical and computational model. **Journal of Chromatography A**, v. 905, p. 269-279, 2001.

GONZÁLEZ, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: GONZÁLEZ, F.H.D. (ed)[et al] **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: 2001.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, p. 729-736, 1999.

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

HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. 5ª edição. Rio de Janeiro (RJ): LTC, 2008, 862p.

HORD, Norman G. et all. Nitrate and Nitrite Content of Human, Formula, Bovine, and Soy Milks: Implications for Dietary Nitrite and Nitrate Recommendations. **Breastfeeding Medicine**. v. 6, n. 6, 2011.

HRUSKA, V.; JAROS, M.; GAS, B.. Simulator 5.3 - free dynamic simulator of electrophoresis. **Electrophoresis**. v. 27, p. 984–991, 2006.

HUANG, X.; WANG, Q.; HUANG, B. Preparation and evaluation of stable coating 1370 for capillary electrophoresis using coupled chitosan as coated modifier. **Talanta**, v. 1371, n. 69, p. 463-468, 2006.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

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

JOHNS, Kara F. et. al. Evaluation of Peakmaster for computeraided multivariate optimisation of a CE separation of 17 antipsychotic drugs using minimal experimental data. **Electrophoresis**. v. 30, p. 839–847, 2009.

JOHNSON, C.J., et al. Fatal outcomes of methemoglobinemia in an infant. **JAMA: The Journal of The American Medical Association**, v. 257, p. 2796-2797, 1987.

KROLOW, A.C.R.; FAGUNDES, C.M. Conservabilidade de leite cru à 20°C pela ativação da lactoperoxidase e adição de tiocianato de sódio, **Revista Brasileira de Agrociência**, v.2, n.2, 109-112, 1996.

LANDERS, J. P. **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 3ª edição. CRC Press: New York, 2008.

KUSSENDRAGER, K.D.; HOOIJDONK, M.A.C. Van. Lactoperoxidase: Physico-Chemical properties, occurrence, mechanism of action and application. **Brit. J. Nutr.**, Cambridge, n. 84, p. 519-525, 2000.

LAUER, H. H.; ROZING, G. P. **High Performance Capillary Electrophoresis**. 2ª edição. Agilent Technologies, Printed in Germany, 2009.

LEVALLOIS, P.; PHANEUF, D. Contamination of drinking water by nitrates: analysis of health risks. **Canadian Journal of Public Health**, v.85, n.3, p.192-196, 1994.

LJINSKI, W. Induction of tumours in rats by feeding nitrosatable amines together with sodium nitrite. **Food and Chemical Toxicology**, v. 22, p. 715-720, 1984.

LUCY, C. A.; MACDONALD, A. M.; GULCEV, M. D. Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 81-105, 2008.

MA, M. et al. Quaternary ammonium chitosan derivative dynamic coating for the separation of veterinary sulfonamide residues by CE with fieldamplified sample injection. **Electrophoresis**, v. 28, p. 4091-4100, 2007.

MANUEL, R. V. G.; **Desenvolvimento de métodos para determinação de cátions inorgânicos em leites, nitrito e nitrato em alface e histamina em peixes utilizando eletroforese capilar**. 2011. 88p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MARTINS, I. et. al. Determination of nitrate and nitrite in milk products commercialized in the southern region of Minas Gerais State, Brazil: Comparison between the flow injection analysis and the spectrophotometric conventional method. **Abstracts of the XII International Congress of Toxicology**, v. 196, Supplement, p. S292, 2010.

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

MERUSI, C. et al. Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal. **Food Chemistry**, Parma, v.129, p.615–620, 2010.

MORAIS, A. A; SILVA, A. L. **Soja: suas aplicações**. Rio de Janeiro: Medsi, 1996.

MORETTI, R. H.,HINOJOSA R.G. **Produção de “leite” de soja em escala semiindustrial**. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). Campinas: ITAL, 1981.

PASCHOA, M.F. A importância de se ferver o leite pasteurizado tipo “C” antes do consumo. **Revista Higiene Alimentar**, v.11, n.52, p. 24-28, 1997.

PÉREZ-OLMOS, R. et al. Sequential potentiometric determination of chloride and nitrate in meat products. **Food Chemistry**, Bilbal, v.59, n. 2, p.305-311, 1997.

PRUITT, K.M. et all.. Lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate: a polarographic study of the oxidation products. **Biochemistry**, v.21, n.3, p.562-567, 1982.

PYELL, U. **Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation and Applications**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2006.

QIN, C. et al. Calorimetric studies of the action of chitosan-N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride on the growth of microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 121-126, 2004.

QUEIROZ, S.C.N.; JARDIM, I.C.S.F.. **Eletroforese Capilar. Chemkeys - Liberdade para aprender**, 2001. Disponível em: <http://chemkeys.com/br/2001/08/18/eletroforese-capilar/>. Acesso em: 10 fev 2017.

RATH, S., XIMENES, M.I.N., REYES, F.G.R. Nitrate and nitrite in vegetables cultivated at Distrito Federal: preliminary study, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 54, p. 126-130, 1994.

REITER, B.; HARNULV, G. Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. **J. Food Prot**, n. 47, p.724-732, 1984.

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

RIBEIRO, F. A. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, Campinas, v. 31, n.1, p. 164-171, 2008.

RIBEIRO, E. L. A.; RIBEIRO, H. J. S. S.. Review Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 229-235, 2001.

ROVAI, G. Laudo parcial confirma intoxicação por nitrito e nitrato em produtos da Holandês. **Diário Catarinense**, Santa Catarina, 27 set. 2012. Disponível em:< <http://dc.clicrbs.com.br/sc/noticias/noticia/2012/09/laudo-parcial-confirma-intoxicacao-por-nitrito-e-nitrato-em-produtos-da-holandes-3899662.html>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

RUIZ-CAPILLAS, C.; ALLER-GUIOTE, P.; JIMENEZ-COLMENERO, F. Application of flow injection analysis to determine protein-bound nitrite in meat products. **Food Chemistry**, Madrid, v. 101, p. 812–816, 2007.

SANTOS, J.S. et al. Nitrato e nitrito em leite produzido em sistemas convencional e orgânico. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v.25, n.2, p.304-309, 2005.

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

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2006.

SEIFU, E. et al. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against food-borne pathogens in Saanen and South African Indigenous goat milk. **Food Control**, v. 15, p. 447–452, 2004.

SHAH, R. S.; WANG, Q.; LEE, M. L. Cycloaliphatic epoxy resin coating for capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.952, p. 267-274, 2002.

SHAMILA-SYUNHADA, A.K. et al. Inactivation of microbiota and selected spoilage and pathogenic bacteria in milk by combinations of ultrasound, hydrogen peroxide, and active lactoperoxidase system. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 120-125, 2016.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, p. 591–611, 1965.

SILVA, P.H.F.. Leite: Aspectos de composição e propriedades. Química e Sociedade. **Química nova na escola**, n.6, 1997.

SIMPSON JR., S. L.; QUIRINO, J. P.; TERABE, S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis Fundamentals and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 504–541, 2008.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical Methods**. Iowa: State University Press, 1989.

SOARES, Denise C. **Aplicação da eletroforese capilar para análise de nitrito e nitrato em ambientes aquáticos: teoria e prática**. 2007, 37p. Dissertação – Programa de Mestrado em Ecologia Aplicada ao Manejo e

Conservação dos Recursos Naturais, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, Belo Horizonte, v. 552, p. 25–35, 2005.

SPUDEIT, D.A.; DOLZAN, M.D.; MICKE, G.A.. Conceitos básicos em eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n.4, p. 287-297, 2012.

STEDRY, M.; JAROS, M.; GAS, B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes. **Journal of Chromatography A**, v. 960, p. 187-198, 2002.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, Campinas, v. 9, p. 173-181, 1996.

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, Melle, v. 23, n. 8, p.535-552, 2004.

TISELIUS, A., **The Moving-Boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins**, Tese de Doutorado, University of Uppsala, Suécia, 1930.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, London, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

TRUJILLO, A.J.; POZO, P.I.; GUAMIS, B. Effect of heat treatment on lactoperoxidase activity in caprine milk. **Small Ruminant Research**, v. 67, p. 243–246, 2007.

VEISSEYRE, R. **Lactologia técnica: composición recogida, tratamiento y transformacio de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1998.

VITALI, L. **Preparação, caracterização e aplicação de capilares modificados com quitosana e sal de quitosana quaternizada em eletroforese capilar.** 2012. 286 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

VITALI, L.; FÁVERE, V.T.; MICKE, G.A.. A new method to determine biological sample volume by short end multiple injection capillary electrophoresis: Application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n.16, p. 2327–2333, 2011.

WALKER, V. Uso terapêutico do leite de cabra na medicina moderna. **Agropecuária Alternativa**, v. 5, n. 25, p. 10-11, 1991.

WESLEY, R. J.; POCKLINGTON, D.; WALKER, R. F. Analytical quality assurance: a review. **Analyst**, v. 116, p. 975- 990, 1991.

WILSON, J.; MATTHEUS, D.M. Metabolic interrelations between cyanide , thiocyanate and vitamins B12 in smokers. **Clinical Sci**, n.31, p.1-5, 1966.

WOLFSON, L.M.; SUMNER, S.S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. **J. Food Prot.**, n.56, p.887-892, 1993.

WOOLLARD, D.C.; INDYK, H.E. Colorimetric determination of nitrate and nitrite in milk and milk powders e Use of vanadium (III) reduction. **International Dairy Journal**, n. 35 p. 88-94, 2014.

YONG, L. et al.. Investigation of concentration of thiocyanate ion in raw cow's milk from China, New Zealand and the Netherlands. **Food Chemistry**, n. 215, p. 61–66, 2017.

ANEXO A

Método Oficial para determinação de nitrito em leite e produtos lácteos - IN nº68 de 12 de dezembro de 2006 do MAPA (BRASIL, 2006).

Princípio: Baseia-se na reação de diazotização de nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea. O produto resultante é determinado espectrofotometricamente a 540 nm.

Procedimento: Pesar 10g de amostra homogeneizada em béquer de 50mL. Transferir para erlenmeyer de 500mL com o auxílio de 100mL de água deionizada quente. Adicionar 5mL solução de tetraborato de sódio a 0,5%. Deixar em banho-maria por 15 minutos, agitando frequentemente. Esfriar à temperatura ambiente. Com o auxílio de um funil e bastão de vidro, passar o conteúdo do erlenmeyer, quantitativamente, para balão volumétrico de 250mL. Lavar bem o erlenmeyer com aproximadamente 50mL de água deionizada quente (60°C). Deixar esfriar. Adicionar 5mL de solução de ferrocianeto de potássio a 15% e 5mL de solução de sulfato ou acetato de zinco a 30%. Agitar por rotação após a adição de cada reagente e completar o volume com água. Filtrar em papel de filtro qualitativo. Transferir 10mL do filtrado para balão volumétrico de 50mL. Adicionar 5mL de solução de sulfanilamida a 0,5%, deixar reagir por 3 minutos, adicionar 3mL de solução de cloreto de alfa-naftiletilenodiamina a 0,5%, agitando após cada adição. Completar o volume com água deionizada e homogeneizar. Deixar em repouso por 30 minutos e ler a 540 nm. Fazer um branco correspondente.

Cálculos:

$$\text{mg mL}^{-1} \text{ nitrito de sódio} = \frac{A \times 25 \times F}{p}$$

Onde:

A = absorbância da amostra; F = fator da curva de nitrito de sódio; p = massa da amostra em gramas;

Método Oficial para determinação de nitrato em leite e produtos lácteos - IN nº68 de 12 de dezembro de 2006 do MAPA (BRASIL, 2006).

.

Princípio: O nitrato é reduzido a nitrito por ação do cádmio esponjoso em meio alcalino. A seguir, é feita a diazotização dos nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea. O produto resultante é determinado espectrofotometricamente a 540 nm.

Procedimento: Pesar 10 g de amostra homogeneizada em béquer de 50mL. Transferir para erlenmeyer de 500mL com o auxílio de 100mL de água quente.

Adicionar 5mL de solução de tetraborato de sódio a 5%. Deixar em banho-maria por 15 minutos, agitando frequentemente. Esfriar à temperatura ambiente. Com o auxílio de um funil e bastão de vidro, passar o conteúdo do erlenmeyer, quantitativamente para balão volumétrico de 250mL. Lavar bem o erlenmeyer com aproximadamente 50mL de água quente (60°C). Deixar esfriar e adicionar 5mL de solução de ferrocianeto de potássio a 15% e 5mL de solução de sulfato ou acetato de zinco a 30%. Agitar por rotação após a adição de cada reagente e completar o volume com água. Filtrar em papel de filtro qualitativo. Transferir uma alíquota de 20mL do filtrado desproteínizado para um erlenmeyer de 125mL. Adicionar 5mL da solução tampão pH 9,6 - 9,7 e aproximadamente 20 g do cádmio esponjoso em cada erlenmeyer. Lavar as paredes do erlenmeyer com o mínimo de água. Colocar no agitador por 15 minutos, no mínimo e deixar sedimentar. Filtrar o sobrenadante em papel de filtro qualitativo, recolhendo diretamente em balão volumétrico de 100mL. Lavar o erlenmeyer no mínimo 3 vezes com água, agitando por 2 minutos a cada lavagem. Sedimentar e filtrar. Lavar o papel de filtro e completar o volume com água. Pipetar 10mL para um balão volumétrico âmbar de 50mL. Adicionar 5mL da solução tampão pH 9,6 - 9,7. Adicionar 5mL da solução de sulfanilamida a 0,5% e agitar. Após 3 minutos adicionar 3mL da solução de cloreto de alfa-naftiletlenodiamina a 0,5% e completar o volume com água. Após 30 minutos (ao abrigo da luz) fazer a leitura a 540nm. O resultado obtido refere-se ao teor de nitritos totais.

Cálculos:

$$\text{mg mL}^{-1} \text{ de nitritos totais} = \frac{A \times 125 \times F}{m}$$

Onde:

A = absorvância da amostra; F = fator da curva de nitrito de sódio; m = massa da amostra em gramas.

$$\text{mg mL}^{-1} \text{ de nitrato} = (\text{nitrito totais} - \text{nitrito}) \times 1,231$$

Onde: 1,231 = fator de conversão dos nitritos em nitratos.

Obs.: Os nitritos são determinados a partir do filtrado desproteínizado e prosseguindo como descrito na metodologia de nitritos.

ANEXO B

Tabela 21. Parâmetros da curva analítica para determinação de nitrito e nitrato por espectrofotometria de UV-Visível através do método de referência da IN nº68 de 12 de dezembro de 2006 do MAPA.

Parâmetros	Nitrito UV-Visível
Linearidade-faixa de calibração (mg L^{-1}) ^a	1,5-25,0
Linearidade-inclinação (L mg^{-1}) ^a	0,01573
Desvio padrão inclinação ^a	$4,1575 \times 10^{-5}$
Linearidade-intercepto ^a	0,0030
Desvio padrão intercepto ^a	$5,5749 \times 10^{-4}$
Linearidade-coeficiente determinação (R^2) ^a	0,9999
Limite detecção, LD (mg L^{-1}) ^b	0,12
Limite quantificação, LQ (mg L^{-1}) ^b	0,35

- (a) Curva de calibração com oito níveis de concentração, cada ponto elaborado em triplicata e medido em triplicata.
- (b) Limites de detecção e quantificação obtidos de acordo com os parâmetros da curva analítica: $LD = (3,3 \times s/S)$; $LQ = (10 \times s/S)$, onde s é a estimativa do desvio padrão do intercepto, e S é a inclinação da curva de calibração.