

Samantha Gonçalves

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA  
DETERMINAÇÃO DE CITRATO, FOSFATO E SULFITO EM  
PESCADO POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Química na área de química analítica.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Florianópolis  
2017

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

Gonçalves, Samantha  
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICA PARA  
DETERMINAÇÃO DE CITRATO, FOSFATO E SULFITO EM  
PESCADO POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA / Samantha  
Gonçalves ; orientador, Gustavo Amadeu Micke, 2017.  
99 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e  
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química,  
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Química. 2. Pescado. 3. Sulfito. 4.  
Eletroforese Capilar. I. Amadeu Micke, Gustavo .  
II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Samantha Gonçalves

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA  
DETERMINAÇÃO DE CITRATO, FOSFATO E SULFITO EM  
PESCADO POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de  
“Mestre em Química” e aprovada em sua forma final pelo Programa  
Pós-Graduação em Química

Florianópolis, 26 de Julho de 2017.

---

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado  
Coordenador do Programa

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina (DQ – Florianópolis)

---

Daniel Alfonso Spudeit, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina (DQ – Florianópolis)

---

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



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria e Sidney por todo carinho e incentivo.

Ao Victor Rodrigues, pelo companheirismo, carinho, compreensão e toda a ajuda em durante esses anos.

Ao professor Gustavo Amadeu Micke pela orientação e ensinamentos.

Ao professor Luciano Vitali, por toda a ajuda e dedicação para a realização desse trabalho.

Ao professor Marcone A. L. de Oliveira pelo auxílio com o ensaio de robustez.

Ao Heitor Daguer e Daniel A. Spudeit por aceitarem fazer parte da banca examinadora e por todas as contribuições nesse trabalho e na minha carreira acadêmica.

Aos laboratórios de camarões marinhos e Aquos e ao MAPA pelas amostras de pescado.

Aos colegas e ex-colegas do laboratório de eletroforese capilar (LabEC).

Ao Luiz Felipe e a Patrícia Kayo por todos os anos de amizade.

Agradeço ao Jadir Carminatti, Graça Hoeller e a Andrezza Rozar da coordenadoria da pós-graduação em química pelos auxílios prestados.

Á UFSC, ao programa de Pós-graduação em Química, á CAPES e ao INCT.



## RESUMO

Pescados são muito suscetíveis à decomposição e por isso são utilizados aditivos para manter a qualidade do produto, porém esses podem ser utilizados para mascarar a qualidade, além de serem usados para fraudes econômicas a fim de modificar o peso final dos pescados. Quando utilizados inadequadamente causam diversos problemas de saúde como alergias, disfunção renal, entre outros. No Brasil é permitido apenas 0,5% de fosfato residual, 0,01% de sulfito em camarão cru. Sendo assim, o presente trabalho trata do desenvolvimento de uma método analítico rápido e simples para a determinação de citrato, fosfato e sulfito em amostras de pescado por eletroforese capilar de zona com detector de UV-Vis. O método foi desenvolvido com o auxílio do *software* Peakmaster 5.2, o qual permitiu obter informações dos parâmetros de separação. O eletrólito para as separações foi composto por 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenosulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido aminocaprílico em pH = 4,5. A separação foi realizada em capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida com comprimento total 38,5 cm e diâmetro interno 75 µm, com injeção 50 mBar/30 s pela extremidade mais afastada do detector e detecção UV indireta em 210 nm. As respostas para os analitos foram lineares em uma faixa de 5-55 mg L<sup>-1</sup>. Os limites de detecção foram 1,80, 1,43 e 1,15 mg L<sup>-1</sup> e os limites de quantificação foram 4,60, 4,79 e 3,88 mg L<sup>-1</sup> para sulfito, citrato e fosfato, respectivamente. A conformidade do sistema apresentou valores de coeficiente de variação menores que 0,89% para área de pico e as precisões intra-ensaio e inter-ensaio apresentaram valores menores que 0,82% e 2,92% para área de pico, respectivamente. Foram analisadas 24 diferentes amostras de pescado da região de Florianópolis. Os resultados mostraram que citrato estava presente em cinco amostras de camarão. Duas amostras de peixe estavam com o teor de fosfato maior que o permitido pela legislação brasileira e duas amostras de camarão estavam com a concentração de sulfito também acima do estipulado. O método proposto mostrou bons resultados para os parâmetros de validação indicando ter potencial para ser empregado em análises de controle de fosfato, citrato e sulfito em amostras de pescado.

**Palavras-chave:** Pescado; sulfito; eletroforese capilar



## ABSTRACT

Fishes are susceptible to decomposition and therefore additives are administered to maintain the quality of the product, however these can be used to mask the quality, furthermore for economic fraud in order to modify the final weight of the fish. When used improperly they cause diverse health problems like allergies, renal dysfunction, among others. In Brazil only 0.5% of residual phosphates and 0.01% of sulfur dioxide in raw shrimp are allowed. Thus, the present work deals with the development of a rapid and simple analytical method for the determination of citrate, phosphate and sulfite in fish samples by capillary electrophoresis with UV-VIS detector. The method was developed with the aid of the software Peakmaster 5.2, which allowed obtaining information of the separation parameters. The electrolyte for the separations consisted of 20 mmol L<sup>-1</sup> of benzenesulfonic acid and 45 mmol L<sup>-1</sup> of aminocaproic acid at pH = 4.5. The separation was carried out in a fused silica capillary with external polyimide coating with total length of 38.5 cm and internal diameter of 75 µm, with 50 mBar/30 s injection at the farthest end of the detector and indirect UV detection at 210 nm. Responses to the analytes were linear in a range of 5-55 mg L<sup>-1</sup>. Limits of detection were 1,80, 1,43 e 1,15 mg L<sup>-1</sup> and the limits of quantification were 4,60, 4,79 e 3,88 mg L<sup>-1</sup> for sulfite, citrate and phosphate, respectively. System suitability showed values of coefficient of variation lower than 0.89% for peak area, and the intra and inter-assay precision presented values lower than 0.82% and 2.92% for peak area, respectively. We analyzed 24 different fish samples from the region of Florianópolis. Citrate have been found in five shrimp samples. Two fish and two shrimp samples presented respectively higher phosphate and sulfite levels than the established by Brazilian. The proposed method showed good results for the validation parameters indicating potential as a monitor for phosphate, citrate and sulfite in fish samples.

**Keywords:** Fish. sulfite. capillary electrophoresis.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática de um equipamento de eletroforese..... 31
- Figura 2.** Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal. 33
- Figura 3.** Variação do fluxo eletrosmótico com o pH em um capilar de sílica fundida. .... 33
- Figura 4.** Curvas de mobilidade efetiva versus pH dos analitos citrato, fosfato e sulfito, do padrão interno malonato e dos componentes do eletrólito de corrida ácido benzenossulfônico e ácido aminocaprílico, feitas utilizando o simulador SimulSC (MICKE, 2004). .... 50
- Figura 5.** Eletroferograma da separação dos analitos. (A) simulação utilizando o software PeakMaster® e (B) separação real dos padrões dos analitos e do malonato. 1- sulfito; 2- malonato; 3- citrato; 4- fosfato. Condições de separação: 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenossulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido aminocaprílico, pH 4,5, injeção 50 mbar, 30 s, -30 kV, Capilar com 38,5 cm de comprimento total (30 cm efetivo), 75 µm diâmetro interno detecção: 210 nm. .... 51
- Figura 6.** Eletroferogramas da separação dos analitos sem a troca do BGE. (A) Primeira análise com o BGE. (B) Após 15 análises com o mesmo BGE (C). Após 25 análises consecutivas. Condição de separação: 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenossulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido aminocaprílico, pH 4,5, injeção 50 mbar, 30 s, -30 kV, Capilar com 38,5 cm de comprimento total (30 cm efetivo), 75 µm diâmetro interno detecção: 210 nm. .... 52
- Figura 7.** Gráfico da corrente gerada em 25 análises consecutivas. (A) Usando recipiente para BGE de 750 µL. (B) Usando recipiente para o BGE de 1,5 mL. Condição de separação: 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenossulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido aminocaprílico, pH 4,5, injeção 50 mbar, 30 s, -30 kV, Capilar com 38,5 cm de comprimento total (30 cm efetivo), 75 µm diâmetro interno detecção: 210 nm. .... 53
- Figura 8.** Eletroferogramas para testar estabilidade da solução padrão de sulfito 100 mg L<sup>-1</sup> e padrão interno malonato 20 mg L<sup>-1</sup>. (A) Primeira injeção. (B) Mesma solução após 40 injeções. Legenda: 1- Sulfato; 2- Sulfito e 3- malonato. Condição de separação: 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenossulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido aminocaprílico, pH 4,5,

injeção 50 mbar, 30 s, -30 kV, Capilar com 38,5 cm de comprimento total (30 cm efetivo), 75 µm diâmetro interno detecção: 210 nm. .... 54

**Figura 9.** Gráfico da razão de área normalizada versus tempo de injeção das soluções de padrões de sulfito com água, soluções tamponadas de TBS e amônio. .... 55

**Figura 10.** Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva externa de sulfito, citrato e fosfato. .... 57

**Figura 11.** Gráficos dos resíduos da regressão linear para as curvas com adição de padrão na matriz de camarão e peixe. .... 60

**Figura 12.** Seletividade simulada no software PeakMaster®. Legenda: Analitos (1) sulfito; (2) malonato, P.I; (3) citrato; (4) fosfato. Interferentes (A) sulfato; (B) cloreto; (C) lactato. Condições de separação simuladas: 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenossulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ácido aminocaprício, pH 4,5; injeção 50 mbar por 30 s, -30 kV. Capilar com 38,5 cm de comprimento total (30 cm efetivo), 75 µm diâmetro interno detecção: 210 nm. .... 63

**Figura 13.** Eletroferogramas dos 15 ensaios realizados em solução padrão e capilar do fabricante A. Legenda: 1-sulfito; 2-malonato; 3-citrato e 4-fosfato. .... 71

**Figura 14.** Eletroferogramas simulados para variação de pH, para avaliação da robustez. .... 72

**Figura 15.** Eletroferogramas das amostras empregando o método validado. A) eletroferograma da amostra de alabote. B) Eletroferograma da amostra de camarão. Legenda: 1 - sulfito, 2 - malonato, 3- citrato, 4- fosfato, a-sulfato e b-lactato. Condições de separação: 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenossulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido aminocaprício, pH 4,5, injeção 50 mbar, 30 s, -30 kV, capilar com 38,5 cm de comprimento total (30 cm efetivo), 75 µm diâmetro interno detecção: 210 nm. .... 74

**Figura 16.** Eletroferogramas dos 15 ensaios realizados em solução padrão e capilar do fabricante A. Legenda: 1-sulfito; 2-malonato; 3-citrato e 4-fosfato. .... 91

**Figura 17.** Eletroferogramas dos 15 ensaios realizados em solução padrão e capilar do fabricante B. Legenda: 1-sulfito; 2-malonato; 3-citrato e 4-fosfato. .... 92

**Figura 18.** Eletroferogramas dos 15 ensaios realizados em solução padrão adicionada na matriz de peixe e capilar do fabricante A. Legenda: 1-sulfito; 2-malonato; 3-citrato; 4-fosfato; 5- lactato. .... 93

**Figura 19.** Eletroferogramas dos 15 ensaios realizados em solução padrão adicionada na matriz de peixe e capilar do fabricante B. Legenda: 1-sulfito; 2-malonato; 3-citrato; 4-fosfato; 5- lactato. .... 94



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Aditivos que podem ser utilizados em pescados, de acordo com a legislação brasileira. ....	26
<b>Tabela 2.</b> Amostras utilizadas no trabalho e suas origens. ....	42
<b>Tabela 3.</b> Planejamento Box-Behnken com 3 fatores aplicado para avaliação do ensaio da robustez. ....	46
<b>Tabela 4.</b> Dados de pKa e mobilidade eletroforética do citrato, fosfato, malonato, ácido benzenossulfônico e ácido aminocapróico. Dados obtidos do software PeakMaster®. ....	49
<b>Tabela 5.</b> Respostas obtidas através de dez injeções consecutivas de uma solução de padrões dos analitos sulfito, citrato e fosfato com padrão interno malonato em concentração igual ao ponto central da curva de calibração. ....	56
<b>Tabela 6.</b> Resultados da linearidade das curvas de calibração externa das soluções padrão sulfito, citrato e fosfato. ....	56
<b>Tabela 7.</b> Resultados de normalidade do teste Shapiro-Wilk da avaliação dos resíduos das regressões das curvas de calibração dos analitos sulfito, citrato e fosfato. ....	58
<b>Tabela 8.</b> Resultados de homocedasticidade do teste de Cochran para avaliação dos resíduos das regressões das curvas de calibração dos analitos sulfito, citrato e fosfato. ....	58
<b>Tabela 9.</b> Valores de F para verificação do ajuste ao modelo linear para curvas externas. ....	59
<b>Tabela 10.</b> Valores do teste de Shapiro-Wilk pra verificar a distribuição normal dos resíduos das curvas de adição de padrão em matriz. ....	61
<b>Tabela 11.</b> Valores do teste de Cochran pra verificar a homocedasticidade dos resíduos das curvas de adição de padrão em matriz. ....	61
<b>Tabela 12.</b> Valores de $F$ para verificação do ajuste ao modelo linear para as curvas de adição de padrão em matriz. ....	62
<b>Tabela 13.</b> Valores de precisão intra e inter-ensaio, avaliado em três níveis de concentração utilizando soluções padrão de sulfito, citrato e fosfato. ....	64

<b>Tabela 14.</b> Valores de recuperação de sulfito, citrato e fosfato obtido em três níveis de concentração adicionado as matrizes de camarão e peixe. ....	64
<b>Tabela 15.</b> Valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) obtidos através da relação sinal/ruído dos eletroferogramas das separações dos analitos sulfito, citrato e fosfato. ....	65
<b>Tabela 16.</b> Planejamento Box-Behnken com 3 fatores; $X_1$ , $X_2$ e $X_3$ aplicado em dois capilares diferentes aplicados em solução padrão e amostra de peixe para avaliação da robustez do método. ....	67
<b>Tabela 17.</b> Fatores e variações para avaliação do parâmetro robustez do método para determinação de sulfito, citrato e fosfato em amostras de pescado.....	68
<b>Tabela 18.</b> Resultados de CRS obtidos nas 60 condições analíticas para avaliação da robustez. ....	69
<b>Tabela 19.</b> Variação das mobilidades dos analitos em função do pH, dados obtidos do PeakMaster® software.....	70
<b>Tabela 20.</b> Resultados da quantificação de sulfito, citrato e fosfato para amostras de peixe e camarão pelo método proposto por eletroforese capilar de zona. ....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Associação de comunidade analítica (do inglês, “*The association of analytical communities*”)

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 isoelétrica capilar (do inglês “*capillary isoelectric focusing*”)

CITP - Isotacoforese capilar (do inglês “*capillary isotachopheresis*”)

CRS – Resolução cromatográfica estatística (do inglês, “*chromatographic resolution statistic*”)

CTGA - Cloreto de trimetil glicidil amônio

CV - Coeficiente de variação

CZE - Eletroforese capilar de zona (do inglês “*capillary zone electrophoresis*”)

DAD – Detector de arranjo de diodos (do inglês “*diode array detector*”)

EMD - Dispersão por Eletromigração (do inglês “*Electromigration Dispersion*”)

EOF - Fluxo Eletrosmótico (do inglês “*Electroosmotic flow*”)

ICH – Conselho internacional para harmonização (do inglês “*International Council for Harmonisation*”)

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LD - Limite de detecção

$L_{det}$  – Comprimento do capilar até a janela de detecção

LQ - Limite de quantificação

$L_{tot}$  – Comprimento total do capilar

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEKC - Cromatografia eletrocinética micelar (do inglês “*micellar electrokinetic chromatography*”)

MMQO – Método dos mínimos quadrados ordinários

P.I. - Padrão Interno

Q.S.P – Quantidade suficiente para obter o efeito desejado

RPM – Rotações por minuto

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>24</b>
2.1	PESCADOS .....	24
2.2	ADITIVOS EM PESCADOS .....	25
2.2.1	<b>Fosfatos .....</b>	<b>27</b>
2.2.2	<b>Sulfito .....</b>	<b>27</b>
2.2.3	<b>Citrato .....</b>	<b>28</b>
2.3	MÉTODOS EMPREGADOS PARA DETERMINAÇÃO DE SULFITO, CITRATO E FOSFATO EM PESCADOS. ....	29
2.4	ELETROFORESE CAPILAR .....	30
2.5	VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	34
2.5.1	<b>Conformidade do sistema .....</b>	<b>34</b>
2.5.2	<b>Linearidade .....</b>	<b>34</b>
2.5.3	<b>Efeito de matriz .....</b>	<b>35</b>
2.5.4	<b>Seletividade .....</b>	<b>36</b>
2.5.5	<b>Precisão .....</b>	<b>36</b>
2.5.6	<b>Exatidão .....</b>	<b>36</b>
2.5.7	<b>Limite de detecção e quantificação .....</b>	<b>37</b>
2.5.8	<b>Robustez .....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>39</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES .....	41
4.2	INSTRUMENTAÇÃO .....	41
4.3	AMOSTRAS .....	42
4.3.1	<b>Preparo das amostras .....</b>	<b>43</b>

4.4	VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	43
4.4.1	Conformidade do sistema.....	43
4.4.2	Linearidade .....	43
4.4.3	Efeito de matriz.....	44
4.4.4	Seletividade.....	44
4.4.5	Precisão.....	45
4.4.6	Exatidão .....	45
4.4.7	Limites de detecção e quantificação .....	45
4.4.8	Robustez.....	45
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
4.6	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO .....	47
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO .....	49
5.1.1	Estabilidade do eletrólito de corrida .....	52
5.1.2	Estabilidade das soluções de sulfito.....	53
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	55
5.2.1	Conformidade do sistema.....	55
5.2.2	Linearidade .....	56
5.2.3	Efeito de matriz.....	59
5.2.4	Seletividade.....	62
5.2.5	Precisão.....	63
5.2.6	Exatidão .....	64
5.2.7	Limites de detecção e quantificação .....	65
5.2.8	Robustez.....	65
5.3	DETERMINAÇÃO DE SULFITO, CITRATO E FOSFATO EM AMOSTRAS DE PESCADO .....	73
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

<b>APÊNDICE A – Eletroferogramas dos ensaios feito com solução de padrões e capilar do fabricante A .....</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE B – Eletroferogramas dos ensaios feito com solução de padrões e capilar do fabricante B. ....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE C – Eletroferogramas dos ensaios feito com adição de solução de padrões em matriz de peixe e capilar do fabricante A. .</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICE D – Eletroferogramas dos ensaios feito com adição de solução de padrões em matriz de peixe e capilar do fabricante B..</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO A – Métodos oficiais para determinação de sulfito e fosfato em pescado .....</b>	<b>95</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O consumo e o comércio mundial de pescado aumentaram consideravelmente nas últimas décadas acompanhando o crescimento demográfico. Com a grande demanda desse alimento torna-se necessária a utilização de artifícios que ajudem a preservar a qualidade do alimento e aumentar o seu tempo de armazenamento evitando deterioração, uma vez que a carne de pescado é muito suscetível à decomposição devido às suas características naturais.

A indústria alimentícia para contornar esses problemas utiliza de aditivos alimentares. Em carne de pescado os mais utilizados são fosfato, sulfito e mais recentemente tem sido especulado o uso de citratos. Esses compostos trazem inúmeros benefícios para conservação desses alimentos, entretanto a indústria pesqueira mundial vem desenvolvendo mecanismos ilícitos para fraudar e adulterar os seus produtos com a utilização desses aditivos. Uma vez utilizados de forma fraudulenta podem causar diversos problemas a saúde do consumidor, como alergias, disfunção renal, dores de cabeça entre outros. Devido a essa problemática, é fundamental o monitoramento do teor dos aditivos citrato, fosfato e sulfito em pescado para que o consumidor desses alimentos consiga ter acesso a um produto sem fraudes e adulterações e que não lhe comprometa a saúde.

Os métodos oficiais utilizados para a determinação dos aditivos sulfito e fosfato são baseados em métodos clássicos individuais para cada analito. Esses métodos são laboriosos, demorados e ainda utilizam grandes quantidades de reagentes tóxicos, além de, gerarem muitos resíduos. Essa problemática juntamente com a grande demanda de análises para o controle de qualidade dos pescados demonstra a necessidade de um novo método menos laborioso e com uma melhor frequência analítica para a determinação de citrato, fosfato e sulfito.

Para monitorar esses aditivos a técnica de eletroforese capilar mostra-se vantajosa devido a suas características como menor tempo de análise e menor custo quando comparada com outras técnicas de separação, viabilizando análises de rotina com boa frequência analítica. Com base nesses fatos, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um novo método para determinação simultânea do teor de citrato, fosfato e sulfito em amostras de pescado.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PESCADOS

Denomina-se pescado todo animal que vive normalmente em água doce ou salgada e que é utilizado para a alimentação. O pescado compreende animais como peixes, crustáceos, moluscos, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada, usados na alimentação humana (BRASIL, 2017).

O pescado destaca-se de outros alimentos de origem animal devido seu alto valor nutricional. Comparativamente este contém grandes quantidades de vitaminas lipossolúveis A e D, minerais cálcio, fósforo, ferro, cobre, selênio, e em animais de água salgada possui também iodo. Além disso, os lipídios presentes nos peixes diferem com o dos mamíferos por conter elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, conhecidos por seus impactos benéficos à saúde (DE OLIVEIRA SARTORI; AMANCIO, 2012). A ingestão de ácidos graxos poli-insaturados como ômega-3 está relacionada com inúmeros benefícios à saúde de quem os consome, como a redução do risco de acidente vascular cerebral (AVC), de depressão, do mal de Alzheimer e de morte por doença cardíaca (ABABOUC, 2005; LEAF, 2007).

As informações dos benefícios do consumo de pescado como alimento juntamente com o contínuo crescimento demográfico e a maior eficiência dos canais de distribuição de produtos, ampliaram a disponibilidade do pescado como fonte de proteína animal aos consumidores. O consumo e a produção pesqueira mundial vêm aumentando de forma contínua nas últimas cinco décadas, atingindo o recorde em 2014 com um total de 167 milhões de toneladas produzidas e ultrapassando bovinos, suínos e aves na produção de proteína animal para consumo. Com esses valores o pescado representa uma parcela de 17% da ingestão de proteína animal por parte da população mundial (FAO, 2016).

Ao contrário do restante do cenário mundial, no Brasil o consumo das demais fontes de proteína ainda é maior em relação ao pescado, entretanto este cenário já vem mudando ao longo das últimas décadas. Segundo o Plano Safra de pesca e aquicultura (2015), desde 2007 a produção de pescado no Brasil aumentou cerca de 80%, e consumo nacional aumentou de 7,7 para 10,7 kg por habitante ao ano. Para aumentar ainda mais a produção de pescado no país o governo brasileiro vem estimulando a pesca de captura e a aquicultura e tem como meta

dobrar a produção aquícola para que em 2020 sejam dois milhões de toneladas de pescado produzidas anualmente (BRASIL, 2015).

Com o aumento da demanda da produção e consumo de pescado no Brasil e no mundo, novas problemáticas surgem quanto ao armazenamento e qualidade do pescado consumido pela população.

## 2.2 ADITIVOS EM PESCADOS

Pescados em geral são muito suscetíveis à decomposição autolítica e bacteriana, entre todos os produtos de origem animal estes são os mais propensos ao processo de deterioração (SOARES et al., 1998). Inúmeros fatores estão relacionados com a deterioração do pescado, dentre eles o alto teor de nutrientes que podem ser utilizados pelos micro-organismos, a rápida e destrutiva ação das enzimas naturais presentes nos tecidos, a alta taxa de atividade metabólica da microbiota, a grande quantidade de lipídeos insaturados e pH próximos à neutralidade (CONNELL, 1980). Para manter a qualidade dos pescados podem ser administrados aditivos de diversas categorias, seja imediatamente após sua captura ou durante o seu processamento, com o objetivo de manter a qualidade do produto por maior tempo. As principais vantagens no uso de aditivos são: aumento no tempo de conservação dos alimentos, evitando desperdícios; melhoria de algumas propriedades do pescado, como a consistência e textura; inibição do aparecimento de micro-organismos patogênicos, entre outros (SAMPAIO; LOBÃO; ROCCO, 2001).

A portaria nº 540, de Outubro de 1997 (BRASIL, 1997) define aditivo alimentar como qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem o propósito de nutrir, e com objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação. Apesar das vantagens obtidas com o uso desses aditivos eles também podem ser utilizados para fraudes e adulterações do pescado. Por isso faz-se necessário o controle desses compostos no produto.

A regulamentação do uso de aditivos em alimentos no Brasil compete a da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e esses compostos só podem ser utilizados caso constem na legislação específica para a sua categoria de alimento. Na Tabela 1, estão listados os aditivos permitidos pela legislação brasileira.

**Tabela 1.** Aditivos que podem ser utilizados em pescados, de acordo com a legislação brasileira.

<b>Aditivo</b>	<b>Produto</b>	<b>Limite máx. (g/100 g ou g/100 mL)</b>
<b>Ácido cítrico</b>	Conservas de pescado	q.s.p
<b>Ácido láctico</b>	Pescado salgado, salgado e prensado, salgado seco (na salga a seco ou na salmoura destinada a sua elaboração)	2,00 sobre o peso do sal empregado
<b>Aroma natural de fumaça (Alimentos aos quais se deseja conferir sabor defumado)</b>	Produtos de pescado defumado (somente nos tipos consagrados)	0,009
<b>Fosfatos: fosfato dissódico ou potássio Polifosfatos: hexametáfosfatos de sódio, metáfosfatos de sódio ou potássio, pirofosfato de sódio ou potássio, tripolifosfato de sódio ou potássio.</b>	Revestimento externo de pescado congelado	0,50
<b>Dióxido de enxofre: metabissulfito de sódio, potássio ou cálcio, sulfito de potássio, bissulfito de cálcio, bissulfito de sódio ou potássio.</b>	Camarões e lagostas (exclusivamente na matéria-prima após a captura)	0,003 (no produto cozido)
	Camarões e lagostas (exclusivamente na matéria-prima após a captura)	0,01 (no produto cru)

Fonte: (BRASIL, 1988).

q.s.p. – quantidade suficiente para obter o efeito desejado.

### 2.2.1 Fosfatos

Fosfato é comumente utilizados como aditivos alimentares na forma de ortofosfato (fosfato de sódio ou de potássio) e polifosfato (tripolifosfato e pirofosfato). Esses compostos possuem a função de aumentar a capacidade de retenção de água e também de proteger o pescado da rancidez oxidativa, oxidação de proteínas e lipídeos, ocasionando uma melhoria na qualidade da carne de pescado e garantindo também melhoras no sabor (AHMED et al., 1983; LARMOND, 1977; MACCALLUM et al., 1964). Possuem, ainda, capacidade de sequestrar íons de metais polivalentes, como o  $\text{Fe}^{3+}$ , importante catalisador das reações de rancidez. Também sequestram íons cálcio, presentes nas ligações corpo-casca do camarão, facilitando as operações de descasque pelo enfraquecimento de tais ligações (ELLINGER, 1972).

A habilidade de restaurar a capacidade de retenção de água das proteínas, mantendo a umidade natural do produto e minimizando as perdas de água durante várias etapas desde o armazenamento até a cocção fez com que alguns segmentos da indústria pesqueira utilizassem dessas propriedades para uma absorção excessiva de água, caracterizada como fraude econômica, e as vezes utilizando também para mascarar um produto de baixa qualidade ou deteriorado (ERDOGDU et al., 2004; GONCALVES; RIBEIRO, 2008).

O excesso de fosfatos caracteriza uma fraude econômica e, além disso, podem provocar uma série de problemas de saúde para quem consome o produto. A exposição excessiva do fosfato pode acarretar problemas graves ao ser humano, como descalcificação, calcificação vascular, disfunção renal, redução de fertilidade e aumento na morte celular (RAZZAQUE, 2011; STEVENS, 2014). Devido a esses problemas a legislação brasileira permite o uso de fosfato apenas na etapa de glaciamento e estipula com um limite máximo residual de 0,5%, 0,5 g de fosfato por 100 g de pescado (BRASIL, 1988).

### 2.2.2 Sulfito

No processamento de alimentos, diferentes agentes sulfitantes têm sido empregados como aditivos alimentares. Estes agentes incluem o dióxido de enxofre e seus sais, sulfito de sódio, bissulfito de sódio e de potássio e metabissulfito de sódio e de potássio.

Esses compostos atuam na inibição da deterioração provocada por bactérias, bolores e leveduras, e na inibição de reações de escurecimento não enzimático e enzimático, a melanose (manchas pretas). A melanose é um processo bioquímico *post-mortem* natural do camarão, que ocorre devido a oxidação enzimática de compostos fenólicos para quinonas pela polifenoloxidase, formando melanina (HAARD; SIMPSON, 2000; HARDISSON et al., 2002).

Apesar da ampla utilização dos sulfitos na indústria de alimentos, o emprego desse aditivo como conservante pode ocasionar alguns problemas como a diminuição da biodisponibilidade de certas vitaminas como a tiamina (B1), ácido fólico (B9), piridoxina, nicotinamida, e assim reduzindo a qualidade nutricional dos alimentos (TAYLOR; HIGLEY; BUSH, 1986). A ingestão de sulfito tem sido associada a reações adversas em algumas pessoas, como broncoespasmos em indivíduos asmáticos sensíveis e também diversas outras doenças como anafilaxia, urticária, angioedema, hipotensão náusea, irritação gástrica local, dores de cabeça, distúrbio do comportamento, erupções cutâneas e diarreia (SCAMPICCHIO et al., 2008; TAYLOR et al., 1988; VALLY; THOMPSON, 2001).

O organismo dos mamíferos possui um sistema de defesa contra a toxicidade dos agentes sulfitantes, através da oxidação do sulfito para sulfato pela enzima sulfito oxidase. Porém pessoas com deficiência da enzima são muito sensíveis à ingestão de sulfito, assim como pessoas asmáticas (FAVERO; RIBEIRO; DE AQUINO, 2011).

No Brasil foi estipulado que a concentração máxima permitida em camarões e lagostas é de 0,01 g por 100 g de produto cru, ou 0,003 g por 100 g de produto cozido (BRASIL, 1988).

### 2.2.3 Citrato

O ácido cítrico e seus sais de baixo peso molecular como o citrato de sódio podem ser utilizados em alimentos com diversas finalidades. Eles podem atuar como antioxidantes, conservantes e também são usados para controlar o crescimento microbiano de diversos tipos de carne, inclusive de pescado, melhorar os atributos sensoriais e aumentar a vida útil do alimento (MACA; MILLER; ACUFF, 1997). Além de suprimir o crescimento de bactérias que degradam alimentos, possui atividade antibacteriana contra outros diversos patógenos alimentares, entre eles *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Clostridium botulinum*, conhecidos

por sua alta patogenicidade e por estarem relacionados com infecções alimentares (KILINC et al., 2009).

O consumo em excesso desses compostos pode causar reações alérgicas, queda de pressão arterial, vermelhidão na pele e dor de cabeça (ROEHR et al., 2004). A legislação brasileira impõe limites apenas para a quantidade de ácido cítrico no pescado em conserva, indicando que pode ser adicionada quantidade suficiente para obter o efeito desejado de acordo com as boas praticas de fabricação (BRASIL, 1988).

### 2.3 MÉTODOS EMPREGADOS PARA DETERMINAÇÃO DE SULFITO, CITRATO E FOSFATO EM PESCADOS.

Para a determinação de fosfato e sulfito é utilizada a Instrução Normativa nº 25/2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece os métodos físico-químicos oficiais para o controle desses aditivos em pescado.

Para análise de fosfato é utilizado um método oficial baseado na conversão do fósforo presente na amostra em ortofosfato. A reação deste com molibdato em meio ácido produz um complexo misto molibdato/fosfato que, na presença do íon vanadato, forma o ácido molibdovanado fosfórico de cor amarelada. A intensidade da cor amarela é proporcional à concentração de íons fosfato na amostra e quantificada espectrofotometricamente a 420 nm.

A análise oficial de sulfito é realiza por um método que mensura sulfito livre e não livre, como os produtos provenientes de adições carbonílicas, em alimentos. Uma amostra é aquecida em presença de ácido clorídrico, convertendo o sulfito em  $\text{SO}_2$ , levados por um fluxo de nitrogênio até uma solução de peróxido de hidrogênio na qual são oxidados a  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . O teor de sulfitos na amostra é então obtido a partir da titulação com uma solução padronizada de NaOH.

Ambos os métodos são antigos possuem preparo laborioso, sendo necessária uma grande quantidade de vidrarias e reagentes tóxicos e/ou corrosivos, o que pode ser de grande risco, tanto para o analista quanto para o meio ambiente, devido a grande quantidade de resíduos gerados.

Novos métodos para a análise de fosfato vêm sendo propostas nos últimos anos, sendo a cromatografia iônica uma das técnicas mais empregadas (CUI; CAI; XU, 2000; DAFFLON et al., 2003; KAUFMANN et al., 2005; SEKIGUCHI et al., 2000). Além disso encontram-se na literatura métodos por eletroforese capilar, usando isotacoforese com detecção por condutividade (DUŠEK et al., 2003; JASTRZEBSKA, 2011; JASTRZEBSKA; HOL; SZŁYK, 2008), e

também eletroforese capilar com detecção indireta no UV (LEE; WHITESIDES, 2010; SHAMSI; DANIELSON, 1995; WANG; LI; ZHANG, 2015).

Para a determinação de sulfito são descritos métodos por cromatografia iônica (COOPER et al., 1986; IAMMARINO et al., 2010; LINDGREN; CEDERGREN; LINDBERG, 1982; MICHIGAMI; MOROOKA; UEDA, 1996), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV (MCFEETERS; BARISH, 2003), eletroforese capilar com detecção indireta (TRENERRY, 1996) e métodos eletroanalíticos (ALAMO; TANGKUARAM; SATIENPERAKUL, 2010; ISAAC et al., 2006; WANG; XU, 2014)

Na literatura são encontrados métodos para determinação de citrato através da cromatografia iônica (GAUCHERON et al., 1996; HOLDEN; LITTLEJOHN; FELL, 1996), eletroforese capilar (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997; MUÑOZ; LÓPEZ-MESAS; VALIENTE, 2010) e métodos eletroquímicos (HIKIMA; HASEBE; TAGA, 1992). Os métodos encontrados na literatura não determinavam citrato em amostras de pescado, mas sim em outras amostras de alimento e amostras biológicas.

Dentre os métodos reportados na literatura não consta nenhum para a determinação simultânea de citrato, fosfato e sulfito em pescado. E das técnicas citadas, a eletroforese capilar (CE, do inglês, “*capillary electrophoresis*”) se destaca por possibilitar o desenvolvimento de um método que possibilite a análise simultânea dos três aditivos em análises rápidas, além de apresentar um custo operacional baixo, quando comparada com outras técnicas (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997).

## 2.4 ELETROFORESE CAPILAR

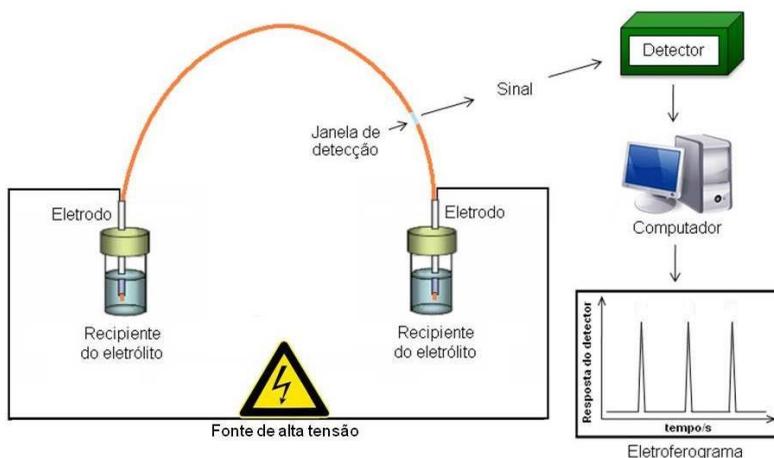
Eletroforese capilar é uma técnica de separação e identificação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis em solução tampão, no interior de um capilar, sob a ação de um campo elétrico, ou ainda, na migração de compostos neutros que possam apresentar uma interação com determinadas substâncias que tenham velocidades de migração diferentes da velocidade de migração do fluxo eletrosmótico (TAVARES, 1996, 1997).

A técnica destaca-se pelas suas vantagens como simplicidade instrumental, rapidez, baixo custo por análise, consumo mínimo de reagentes e solventes, pouco volume de amostra requerida para injeção, na ordem de nanolitros, alto poder de separação, completa automação da

análise e compatibilidade com diversos sistemas de detecção. As suas aplicações são encontradas em muitas áreas como, química, farmacêutica, alimentícia, médica e forense (PIÑERO; BAUZA; ARCE, 2011).

Uma das características importantes da CE é a simplicidade da sua instrumentação, como mostrado na Figura 1. O equipamento consiste basicamente em uma fonte de alta tensão, capilar, um par de eletrodos, detector apropriado e um computador para o tratamento dos dados (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

**Figura 1.** Representação esquemática de um equipamento de eletroforese.



Fonte: MICKE (2004)

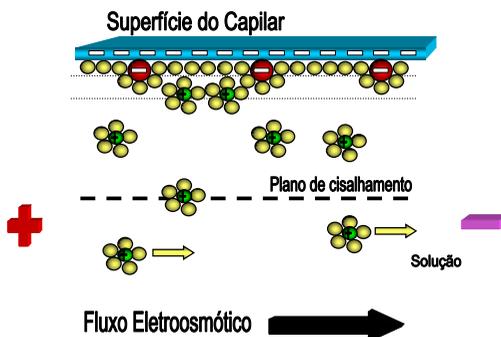
A CE possui diversos modos de separações eletrodirigidas que utilizam diferentes mecanismos de separações. Esses modos podem ser agrupados em subclasses: a cromatografia electrocinética micelar (MEKC), eletroforese capilar em gel (CGE), cromatografia electrocinética capilar (CEC) e isotacoforese capilar (CITP) (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). No entanto o modo de operação mais utilizado e também o modo utilizado neste trabalho é a eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *capillary zone electrophoresis*), que consiste na separação química de compostos ionizados pela diferença de velocidade de migração dos mesmos frente à solução de um eletrólito de corrida (BGE, do inglês *background electrolyte*), o qual deve preencher completamente o interior do capilar. Ao aplicar potencial, um campo

elétrico é gerado fazendo com que os solutos migrem em zonas distintas dentro do capilar (LANDERS, 2007).

Muitos tipos de detectores podem ser utilizados em CE, como MS, detectores eletroquímicos e fluorescência, porém os detectores usuais mais empregados são baseados em medição da absorvância UV-Vis, como o DAD (do inglês, *diode array detector*) (TAVARES, 1996). A escolha deste detector está relacionada com a medida direta da absorção, o que deixa limitado aos compostos que possuem uma absorvância molar relativamente alta. É problemática utilização da detecção de absorção direta em espécies que possuem baixa absorvância molar. Contudo, é possível um modo de detecção indireto, que utiliza um componente do eletrólito de corrida com grupos cromóforos. A detecção indireta ocorre pela diminuição transiente do sinal do eletrólito, devido ao deslocamento do co-íon cromóforo pelo analito durante a passagem deste pelo detector (JAGER; TAVARES, 2001).

Um fenômeno inerente à técnica de eletroforese e importante para o entendimento da separação que ocorre no interior do capilar, é o fluxo eletrosmótico. Este fenômeno ocorre devido a presença dos grupos silanóis (SiOH) presentes na sílica, a qual compõe os capilares utilizados em CE. Esses grupos possuem um caráter levemente ácido ( $pK_a \approx 4-6$ ) e em contato com a solução de BGE os grupamentos são ionizados (SiO<sup>-</sup>) e liberam H<sup>+</sup> para a solução que preenche o capilar (LANDERS, 2007). A certa distância da parede negativa do capilar, chamado plano de cisalhamento, não há mais atração entre o próton solvatado e os grupos SiO<sup>-</sup>. A aplicação de um potencial faz com que esses prótons se movam em direção ao eletrodo de carga negativa (cátodo), gerando um deslocamento denominado de fluxo eletrosmótico normal (EOF, do inglês *electroosmotic flow*) ou também chamado de fluxo catódico, conforme ilustra a Figura 2.

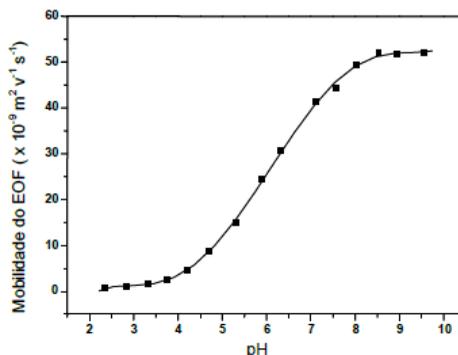
**Figura 2.** Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal.



Fonte: MICKE (2004)

A magnitude do EOF em capilares de sílica é dependente do grau de ionização da parede do capilar, por isso o eletrólito utilizado deve ser tamponado no pH desejado, para que não haja variações do fluxo durante a análise. Uma solução de eletrólito com pH inferior a 2 gera um EOF desprezível, pois a maioria dos grupos silanóis permanecem protonados, no entanto em pHs elevados o EOF apresenta uma magnitude muito alta devido ao alto grau de ionização da parede do capilar e, portanto, o fluxo é muito alto (Figura 3). Desta maneira, o pH do meio deve considerar tanto a ionização dos analitos quanto magnitude do EOF, para que condições adequadas e ótimas sejam utilizadas (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012; TAVARES, 1996).

**Figura 3.** Variação do fluxo eletrosmótico com o pH em um capilar de sílica fundida.



Fonte: (VITALI, 2012)

## 2.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação é o processo de determinação de um requisito analítico e de confirmação de que o método sob consideração possui capacidade de desempenho consistente com os requisitos de aplicação. Esta constitui o processo de determinação dos parâmetros de desempenho e das limitações de um método, com identificação dos fatores que podem mudar estes parâmetros e em qual extensão (EURACHEM, 1998). Devem ser validados métodos não normalizados, novos métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados que são usados fora dos escopos para os quais foram idealizados, assim como modificações realizadas em métodos já normalizados (INMETRO, 2011a).

Diferentes protocolos de validação de métodos analíticos podem ser empregados, dentre eles os mais utilizados são EURACHEM, INMETRO, AOAC, ANVISA, MAPA e ICH. Nesses protocolos estão presentes os parâmetros a serem avaliados, entre eles estão: conformidade do sistema, linearidade, exatidão, precisão, robustez e limites de detecção e quantificação.

### 2.5.1 Conformidade do sistema

O ensaio de conformidade de sistema é a primeira etapa do processo de validação, na qual comprova a adequação do sistema de análise e sua capacidade de prover resultados confiáveis (HUND et al., 2002; RIBANI et al., 2004). Apesar de não ser todos os protocolos de validação que indiquem o estudo desse parâmetro, é importante garantir a confiabilidade dos dados antes das outras etapas da validação.

Na conformidade do sistema podem ser estudadas diferentes respostas, como coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos, CV do tempo, resolução, número de pratos teóricos (N), entre outros (RIBANI et al., 2004).

### 2.5.2 Linearidade

Corresponde a habilidade do método em fornecer respostas proporcionais à concentração do analito em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2011). Sua avaliação é frequentemente

realizada pelo preparo de curvas de calibração com e sem matriz, em sua maioria com cinco a seis níveis de concentração equidistantes, e com o mínimo de duas réplicas por nível (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) é considerado uma das ferramentas estatísticas mais adequadas para a avaliação da linearidade e é recomendada pela maior parte dos protocolos de validação (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005), além da inspeção visual do gráfico  $x$ - $y$  e do gráfico de resíduos, que permite detectar problemas de ajuste da curva, como os desvios da linearidade. Em uma curva bem ajustada os resíduos devem estar dispostos de forma aleatória em torno do zero e normalmente distribuída, ter variância homogênea (homoscedasticidade) e precisam ser independentes (DE SOUZA FERREIRA, 2007).

Para verificar a ausência de valores discrepantes nos resíduos pode ser empregado o teste de *Grubbs* ou de resíduo *Jackknife*, a distribuição da normalidade pode ser feita pelo teste de *Ryan-Joiner* ou *Shapiro-Wilk*, a homoscedasticidade pelos testes de *Bartlett*, *Cochran*, *Levene* ou *Brown-Forsythe*, a independência pode ser verificada pelo teste de *Durbin-Watson* e a avaliação do ajuste ao modelo linear pode ser realizada por teste F de *Snedecor* (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; DE SOUZA FERREIRA, 2007; GRANATO; DE ARAÚJO CALADO; JARVIS, 2014; INMETRO, 2011a; NUNES et al., 2015).

### 2.5.3 Efeito de matriz

A avaliação do efeito de matriz é o estudo de possíveis interferentes da amostra que podem causar alterações no sinal do analito e no desempenho do método. A avaliação do efeito da matriz pode ser feita por adição de padrão em uma amostra ou utilizando uma amostra 'branca' que seja isenta dos analitos estudados, além disso, deve ser avaliada a linearidade da curva em matriz, da mesma forma como é feita a avaliação da linearidade na curva com padrões (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998).

Para a avaliação desse efeito é realizada a comparação da inclinação obtida para a curva em matriz e em solução de padrões nas mesmas proporções de solvente. Caso não haja diferença significativa entre as inclinações das curvas, o efeito de matriz pode ser considerado negligenciável (TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004).

### **2.5.4 Seletividade**

Uma amostra é composta tanto pelo analito que se deseja medir, quanto pelo restante da matriz e outros componentes que podem trazer algum efeito na medição. A seletividade é o parâmetro que avalia a interferência desses outros componentes na detecção do analito (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; INMETRO, 2011a). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse e não de outro interferente.

### **2.5.5 Precisão**

O ensaio de precisão é considerado um dos parâmetros de validação mais importante, ele avalia a dispersão dos resultados entre análises independentes e suas respostas para a precisão são dadas em termos de coeficiente de variação (CV) (DE SOUZA FERREIRA, 2007; INMETRO, 2007).

A precisão é dependente da concentração dos analitos e por isso deve ser determinada para diferentes níveis de concentração. As formas mais utilizadas para expressar a precisão são por meio da: Repetitividade, também chamada de precisão intra-ensaio, que avalia a variabilidade das respostas encontradas utilizando o mesmo método, analista instrumentação, no mesmo laboratório e com repetições realizadas no menor espaço de tempo possível; Precisão intermediária ou também precisão inter-ensaio, que representa a variabilidade dos resultados de um laboratório e está relacionada com as respostas obtidas com o mesmo método, mesmo laboratório mas variando alguma condição que pode ser analista, equipamento ou tempo; e também a precisão pode ser expressa pela reprodutibilidade que representa a variabilidade encontrada em utilizando o mesmo método com diferentes analistas e em diferentes laboratórios (INMETRO, 2011a; RIBEIRO et al., 2008; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

### **2.5.6 Exatidão**

O ensaio de exatidão descreve o quão próximo o valor medido está do valor verdadeiro (INMETRO, 2011; RIBANI et al., 2004; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Os procedimentos utilizados para a avaliação da exatidão são: uso de materiais de referência, comparações interlaboratoriais, comparação do método proposto com um método de referência e realização de ensaios de recuperação.

Materiais de referência certificados são escassos e possuem altos custos de aquisição. Quando não é possível a utilização desses materiais pode ser utilizada amostra branca da matriz ou ainda a própria matriz pode ser utilizada e adicionada a ela quantidades conhecidas do analito para a realização do ensaio de recuperação, que é o método mais utilizado para o ensaio da exatidão (DE SOUZA FERREIRA, 2007).

### **2.5.7 Limite de detecção e quantificação**

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada do ruído do instrumento usado pela medição, mas não necessariamente quantificada, sob as condições de ensaio estabelecida. O limite de quantificação é a menor concentração do composto estudado que pode ser determinada pelo método com exatidão e precisão aceitáveis (DE SOUZA FERREIRA, 2007; RIBANI et al., 2004).

Para a determinação dos limites costumam ser empregados diversos métodos, porém o mais utilizado é a relação sinal ruído, onde LD e LQ são determinados por meio da comparação entre a medição dos sinais dos analitos. O LD três vezes maior que a razão sinal/ruído é considerável aceitável, já o LQ é aceitável quando o sinal é 10 vezes maior que a razão sinal/ruído (INMETRO, 2011).

### **2.5.8 Robustez**

A robustez de um método está relacionada com a sua capacidade em resistir a pequenas variações deliberadamente feitas nos parâmetros do método sem alterar significativamente sua exatidão e precisão. Um método robusto é aquele que se mostra praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer enquanto este esteja sendo executado (INMETRO, 2011).

Os testes de robustez indicam os fatores que podem mudar significativamente as respostas do método proposto. Esse teste fornece a dimensão dos problemas que podem ocorrer quando o método for aplicado com outras condições ou em outro laboratório (CÉSAR; PIANETTI, 2009).



### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método para determinar simultaneamente o teor de citrato, fosfato e sulfito em amostras de pescado utilizando eletroforese capilar de zona com detector de arranjo de diodos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar os *softwares PeakMaster<sup>®</sup>* e *SIMULSC<sup>®</sup>* para auxiliar na escolha dos componentes do eletrólito de corrida e suas concentrações;
- Utilizar o *software PeakMaster<sup>®</sup>* para selecionar os parâmetros instrumentais das análises para a separação de citrato, fosfato e sulfito;
- Avaliar a durabilidade do eletrólito de corrida ao longo das corridas com base na corrente elétrica gerada no capilar e na separação dos analitos;
- Avaliar o desempenho do método proposto com o auxílio de ferramentas e testes estatísticos a partir de parâmetros de validação como a linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, robustez e efeito de matriz;
- Aplicar o método desenvolvido e validado na determinação de citrato, fosfato e sulfito em diferentes amostras de camarão e peixe.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Foram utilizados para o preparo de todas as soluções reagentes de grau analítico e água ultrapura deionizada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). O ácido benzenossulfônico e o ácido aminocapróico utilizados na composição do eletrólito de corrida foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A), assim como o padrão de sulfito de sódio e ácido malônico. Os padrões de citrato de potássio e fosfato de sódio foram produzidos pela Labsynth (Diadema, SP, Brasil). Foram preparados estoques individuais dos ácidos benzenossulfônico e aminocapróico ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) para o preparo diário do eletrólito de corrida na concentração de  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido benzenossulfônico e  $45 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido aminocapróico. Os padrões de citrato, fosfato e malonato foram preparados diariamente na concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  em água e o sulfito em TBS  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Outros reagentes utilizados foram a acetonitrila fabricado pela Tedia (São Paula, SP, Brasil), tetraborato de sódio (TBS) da Sigma-Aldrich e hidróxido de sódio da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

### 4.2 INSTRUMENTAÇÃO

As análises foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar modelo 7100 fabricado pela Agilent Technologies (Palo Alto, CA, E.U.A) e equipado com detector de arranjo de diodos. Foram utilizados capilares de sílica fundida, com revestimento externo de poliimida produzido pela Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, E.U.A) com  $75 \mu\text{m}$  de diâmetro interno,  $38,5 \text{ cm}$  de comprimento total ( $L_{\text{Tot}}$ ) e  $30 \text{ cm}$  de comprimento até o detector ( $L_{\text{Det}}$ ). O condicionamento inicial dos capilares foi realizado utilizando pressão de  $940 \text{ mbar}$  durante  $30 \text{ minutos}$  com  $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$  seguido por  $30 \text{ minutos}$  de água deionizada. No início de cada dia, o capilar foi condicionado com lavagem de  $10 \text{ minutos}$  de  $\text{NaOH}$ ,  $10 \text{ minutos}$  de água deionizada e  $10 \text{ minutos}$  com eletrólito de corrida, todos com  $940 \text{ mbar}$  de pressão.

As amostras e os padrões foram inseridos no capilar pela extremidade mais distante (*outlet*) por injeção hidrodinâmica de  $50 \text{ mbar}$  por  $30 \text{ segundos}$ , e para a separação foi aplicada uma tensão de  $30 \text{ kV}$  com polaridade negativa na injeção. A detecção dos analitos foi realizada de modo indireto em  $210 \text{ nm}$ . Para aquisição e tratamento de dados foi utilizado o *software Chemstation*®, ver. A.06.01.

## 4.3 AMOSTRAS

Foram analisadas ao todo nove amostras de camarão e quinze amostras de peixes de diferentes espécies. As amostras foram adquiridas do comércio da cidade de Florianópolis e também doadas pelo MAPA e pelos laboratórios de aquicultura da UFSC no período de Dezembro de 2016 à abril de 2017.

**Tabela 2.** Amostras utilizadas no trabalho e suas origens.

<b>Amostra</b>	<b>Origem</b>
<b>Camarão 1</b>	Comercial
<b>Camarão 2</b>	Comercial
<b>Camarão 3</b>	Comercial
<b>Camarão 4</b>	Comercial
<b>Camarão 5</b>	Comercial
<b>Camarão 6</b>	UFSC*
<b>Camarão 7</b>	Comercial
<b>Camarão 8</b>	Comercial
<b>Camarão 9</b>	MAPA
<b>Abrótea</b>	Comercial
<b>Alabote</b>	Comercial
<b>Atum</b>	Comercial
<b>Cação</b>	Comercial
<b>Corvina</b>	Comercial
<b>Linguado</b>	Comercial
<b>Misturinha</b>	Comercial
<b>Namorado</b>	Comercial
<b>Pescada</b>	Comercial
<b>Polaca do Alasca</b>	Comercial
<b>Salmão</b>	Comercial
<b>Sardinha</b>	Comercial
<b>Tainha</b>	Comercial
<b>Tilápia</b>	UFSC*
<b>Tilápia</b>	Comercial

Fonte: Próprio autor.

\*Amostras de peixe e camarão adquiridas dos laboratórios de aquicultura da UFSC.

### 4.3.1 Preparo das amostras

Primeiramente todas as amostras foram trituradas até o ponto de uma pasta homogênea com o auxílio de um mixer e armazenadas sob-refrigeração até o momento do preparo para as análises.

Em um tubo de fundo cônico de 50 mL foi pesado 1 g de amostra triturada e adicionado 5 mL de água para as amostras de peixe, ou 5 mL de água com 5 mmol L<sup>-1</sup> de tetraborato de sódio para amostras de camarão, em seguida as amostras foram vigorosamente agitadas em vórtex por 2 minutos, depois deixadas em ultrassom durante 8 minutos. Foi então coletado 500 µL da solução das amostras e inserido em um micro tubo com 1 mL de acetonitrila para a precipitação das proteínas presentes na amostra. Na sequência a amostra foi agitada e submetida à centrifugação de 14500 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi coletado e diluído adequadamente com padrão interno na concentração final de 20 mg L<sup>-1</sup> e água para análise no equipamento de eletroforese.

## 4.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação analítica foi realizada baseada nos protocolos de validação de métodos como o INMETRO, ANVISA, AOAC e EURACHEM. Os parâmetros de validação avaliados foram: conformidade do sistema; linearidade; efeito de matriz; seletividade; precisão; exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez.

### 4.4.1 Conformidade do sistema

O ensaio de conformidade foi avaliado pelo CV de dez injeções consecutivas de uma solução de padrões com os três analitos do estudo em concentração igual ao ponto central da curva de calibração. Os parâmetros avaliados foram: área do pico corrigida pelo padrão interno ( $\text{Área}_{\text{analito}}/\text{Área}_{\text{P.I.}}$ ) e tempo de migração corrigido pelo padrão interno ( $t_{\text{m Analito}}/t_{\text{m P.I.}}$ ).

### 4.4.2 Linearidade

Foram construídas curvas de calibração em soluções padrões com 10% de ACN, para avaliar a linearidade. As curvas foram preparadas em triplicata, com seis níveis de concentração distribuídos de forma equidistante, na faixa de 5 a 55 mg L<sup>-1</sup> e injetados aleatoriamente.

Foi utilizado o método dos mínimos quadrados ordinários para as

curvas de calibração. O gráfico de resíduos da regressão linear foi utilizado para averiguar visualmente a presença de valores divergentes (*outliers*), sendo esses submetidos ao teste de Grubbs (GRUBBS, 1969) para confirmação.

$$G = \frac{|\bar{x} - x_i|}{s} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$\bar{x}$  é a média das replicatas;

$x_i$  é a replicata suspeita de ser o ponto discrepante;

$s$  é o desvio padrão das medidas da replica.

A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), o teste de Cochran (COCHRAN, 1941) foi usado para avaliação da homocedasticidade, a independência foi feita a partir do teste de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1951), e o ajuste do modelo linear foi feito pelo teste F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989).

#### 4.4.3 Efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado pela construção de curvas de calibração pela adição de padrão nas matrizes de peixe e camarão. O ajuste ao modelo linear foi verificado pelos mesmos testes estatísticos feitos nas curvas em solução padrão. Foi verificada a presença de *outliers*, normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos.

A avaliação do efeito de matriz foi realizada pela comparação dos coeficientes angulares das curvas de calibração preparadas em solução padrão e das curvas de calibração preparadas em matriz de peixe e camarão. O resultado da divisão dos coeficientes angulares estando entre 0,9 e 1,1 é considerado a inexistência do efeito de matriz (HOFF et al., 2015).

#### 4.4.4 Seletividade

Foi utilizado para a avaliação da seletividade do método o *software PeakMaster*®, que possibilita simular a presença de possíveis interferentes presente nas amostras. Foram feitas simulações dos parâmetros do método como composição do eletrólito de corrida (20

mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenossulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido amino capróico), tensão (30 kV), comprimento total do capilar (38,5 cm), comprimento do capilar até o detector (30 cm), detecção indireta feita pelo ácido benzenossulfônico foi selecionado. Foram adicionados na simulação os analitos, padrão interno e os possíveis interferentes para as análises: cloreto, sulfato e lactato.

#### 4.4.5 Precisão

A precisão intra-ensaio (repetibilidade) foi realizada por três injeções consecutivas de soluções de padrões de sulfito, citrato e fosfato em três concentrações diferentes, junto com o padrão interno malonato que foi mantido constante na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup>. A precisão inter-ensaio (reprodutibilidade) foi determinada por injeções dos padrões dos analitos em três concentrações diferentes e mantendo o padrão interno constante, em três dias diferentes ao longo de duas semanas. Ambas as precisões foram avaliadas pelo coeficiente de variação.

#### 4.4.6 Exatidão

O ensaio de recuperação foi utilizado para a avaliação da exatidão do método proposto. Foram feitas recuperações para as amostras de camarão e de peixe, fortificadas em três níveis de concentração da curva de calibração, preparadas em triplicata e injetadas de forma aleatória. O cálculo de recuperação das amostras foi realizado com a equação 2 abaixo.

$$Rec (\%) = \frac{C_{amostra\ fortificada} - C_{amostra\ não\ fortificada}}{C_{adicionada}} \times 100$$

(Equação 2)

#### 4.4.7 Limites de detecção e quantificação

Os limites foram calculados pela relação sinal/ruído, sendo o LD 3 vezes a relação sinal/ruído e o LQ 10 vezes a relação do sinal/ruído.

#### 4.4.8 Robustez

Para avaliar a robustez do método foi proposto planejamentos Box-Behnken com três fatores e três níveis com triplicata do ponto

central, sendo esses planejamentos realizados em amostra de pescado e em soluções de padrões. Os fatores avaliados foram ultrassom, precipitação com acetonitrila e pH do BGE. Outro fator avaliado foi o fabricante do capilar, sendo um planejamento realizado no capilar do fabricante A com revestimento de poliimida e outro planejamento realizado no capilar do fabricante B com revestimento de poliacrilato. Entre cada corrida os capilares foram lavados com NaOH, água deionizada e BGE por 10 minutos cada.

**Tabela 3.** Planejamento Box-Behnken com 3 fatores aplicado para avaliação do ensaio da robustez.

Ensaio	Fatores		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

X<sub>1</sub> - Tempo de ultrassom (min): (-1): 7,8; (0): 8,0; (1): 8,2

X<sub>2</sub> - Porcentagem de ACN para precipitação de proteína (%): (-1): 62,0; (0): 67,0; (1): 72,0

X<sub>3</sub> - pH do BGE: (-1): 4,13; (0): 4,53; (1): 4,93

As respostas foram avaliadas em função do valor de CRS (do inglês, *chromatographic resolution statistic*), uma função que leva em consideração a resolução de todos os pares de picos simultaneamente (SCHLABACH; EXCOFFIER, 1988). A partir dos eletroferogramas o valor de CRS foi calculado com a equação 3 abaixo:

$$CRS = \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} \left[ \frac{(R_{i,i+1} - R_{ot})^2}{(R_{i,i+1} - R_{min})^2 R_{i,i+1}} \right] + \sum_{i=1}^{n-1} \frac{R_{i,i+1}^2}{(n-1)R_{med}^2} \right\} \frac{t_n}{n}$$

**(Equação 3)**

Onde:

$R_{i,i+1}$  é a resolução entre pares adjacentes;

$R_{med}$  é a resolução média de todos os pares de soluto;

$R_{ot}$  é a resolução ótima ou desejada, foi utilizada resolução de 2;

$R_{min}$  é a resolução mínima aceitável, foi usada resolução de 1,5;

$t_n$  é o tempo de migração do último analito;

$n$  é o número de analitos.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento de dados e a análise estatística foi realizada utilizando os *softwares Minitab 15, Statistica 7.0, Assistat 7.7* e Microsoft Excel 2010.

#### 4.6 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

Para desenvolver e otimizar o método foram utilizados os *softwares PeakMaster<sup>®</sup>* e *SIMULSC<sup>®</sup>*. As condições ideais foram escolhidas pelos dados de mobilidade e pKa disponíveis no banco de dados e pelas respostas do tempo de migração, dispersão dos picos e capacidade tamponante do eletrólito.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

A partir da utilização combinada do *software SIMULSC*, para gerar curvas de mobilidade efetiva versus pH e o *software PeakMaster®* para a otimização e simulação da separação, é possível desenvolver e melhorar métodos para eletroforese capilar (DOLZAN et al., 2013; SPUDEIT et al., 2016; VITALI et al., 2013). Uma das principais vantagens da utilização desses *softwares* é a obtenção das principais informações para desenvolvimento de métodos com reduzidos números de experimentos, com baixo gasto de reagentes e de geração de resíduos.

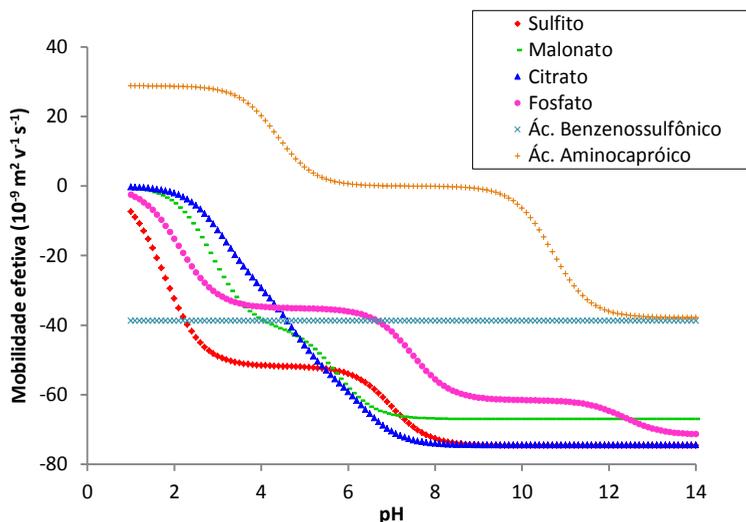
**Tabela 4.** Dados de pKa e mobilidade eletroforética do citrato, fosfato, malonato, ácido benzenossulfônico e ácido aminocaprício. Dados obtidos do *software PeakMaster®*.

Composto	pKa	Mobilidade eletroforética ( $\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ )
<b>Citrato</b>	3,13 ; 4,76 ; 6,39	-28,70 ; -54,70 ; -74,40
<b>Fosfato</b>	2,16 ; 7,21 ; 12,67	-34,60 ; -61,40 ; -72,50
<b>Malonato (P.I)</b>	2,85 ; 5,05	-40,70 ; -67,00
<b>Sulfito</b>	1,78 ; 6,99	-51,80 ; -74,60
<b>Ác. Benzenossulfônico</b>	-2,00	-38,70
<b>Ác. Aminocaprício</b>	4,37 ; 10,75	+28,80 ; -37,8

Os analitos sulfito, citrato e fosfato apresentam baixa ou nenhuma absorvidade molar, sendo necessário desenvolver um método com detecção indireta. Portanto, o co-íon do BGE deve absorver no UV-Vis. Também se deve levar em consideração a sua mobilidade eletroforética, o desejado é que possua um valor de mobilidade próximo à mobilidade dos analitos para minimizar os problemas de assimetria e alargamento de pico devido ao fenômeno de dispersão por eletromigração (EMD, do inglês “*electromigration dispersion*”). Como os valores de mobilidade eletroforética dos três analitos não são próximas, não é possível encontrar um co-íon com mobilidade adequada para os três, sendo melhor optar por um co-íon com valor de mobilidade próximo ao valor de mobilidade médio dos três analitos. A partir dessas informações foi escolhido o ácido benzenossulfônico como co-íon, pois este composto possui absorção em 210 nm, e tem um valor de mobilidade que está

entre o valor de mobilidade dos três analitos, como mostrado na Tabela 4.

**Figura 4.** Curvas de mobilidade efetiva versus pH dos analitos citrato, fosfato e sulfito, do padrão interno malonato e dos componentes do eletrólito de corrida ácido benzenossulfônico e ácido aminocapróico, feitas utilizando o simulador SimulSC (MICKE, 2004).



Fonte: Próprio autor

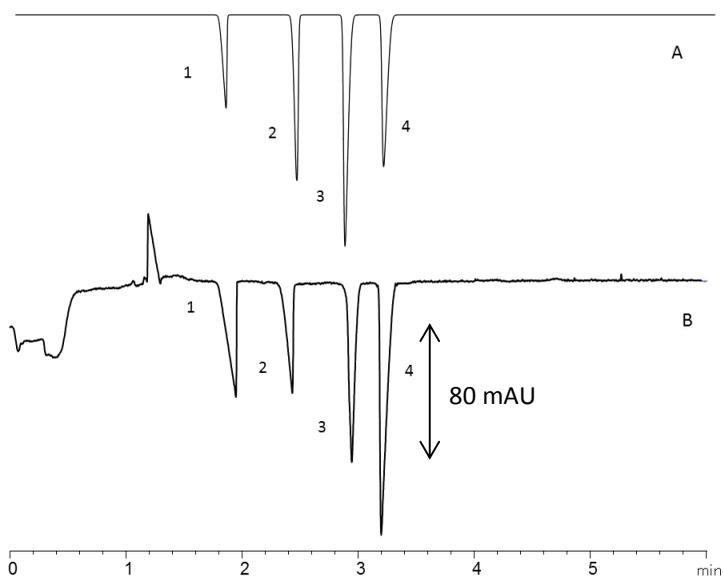
Analisando o gráfico de mobilidade (Figura 4) eletroforética versus pH conclui-se que o pH ideal do BGE para a separação deve estar na faixa de 4,0 á 4,7, visto que, é a condição onde os analitos apresentam mobilidades diferentes e o tempo de análise não seja comprometido pela ação do fluxo eletrosmótico. Sabendo que o ácido benzenossulfônico não possui capacidade tamponante, foi escolhido como contra-íon o ácido aminocapróico que possui pka 4,37 e fornece uma boa capacidade tamponante ao eletrólito de corrida na faixa de pH ideal para a separação.

Com o proposito de melhorar a precisão e exatidão do método foi adicionado um padrão interno nas análises. O malonato foi escolhido como padrão interno por não absorver na região do UV, assim como os analitos, e também por não estar presente nas amostras de pescado, além de possuir um valor de mobilidade próxima a dos demais analitos.

As condições ideais para a completa separação dos analitos foram obtidas no *software PeakMaster*® onde os melhores valores pH , EMD,

tempo de análise e capacidade tamponante foram obtidas com o BGE composto por 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenossulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido aminocaprílico. Além disso, essa condição proporcionou uma baixa condutividade e baixa força iônica, que é desejável para que minimize a geração de calor no capilar, possibilitando então o uso de altas tensões para alcançar separações com reduzidos tempos de análise.

**Figura 5.** Eletroferograma da separação dos analitos. (A) simulação utilizando o software PeakMaster® e (B) separação real dos padrões dos analitos e do malonato. 1- sulfito; 2- malonato; 3- citrato; 4- fosfato. Condições de separação: 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenossulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido aminocaprílico, pH 4,5, injeção 50 mbar, 30 s, -30 kV, Capilar com 38,5 cm de comprimento total (30 cm efetivo), 75 µm diâmetro interno detecção: 210 nm.



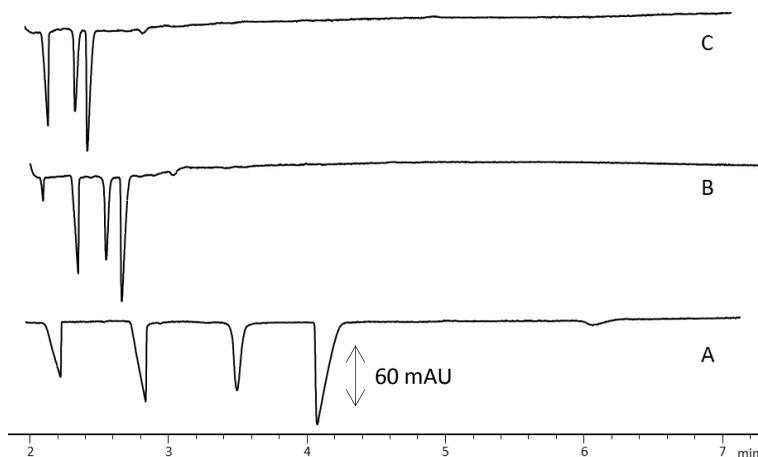
Fonte: Próprio autor

É possível observar na Figura 5 a similaridade entre o eletroferograma simulado e o eletroferograma real, o que constata a conveniência da utilização de *softwares* como o PeakMaster® e SimulSC para o desenvolvimento e otimização de métodos para eletroforese capilar. A figura demonstra também que as condições simuladas foram escolhidas corretamente para uma rápida separação dos analitos.

### 5.1.1 Estabilidade do eletrólito de corrida

Após várias corridas consecutivas foi verificado que o eletrólito de corrida não exibiu uma durabilidade adequada, pois em poucas corridas observava-se uma mudança no tempo de migração dos analitos, o que afetava tanto a resolução quanto o tempo de análise.

**Figura 6.** Eletroferogramas da separação dos analitos sem a troca do BGE. (A) Primeira análise com o BGE. (B) Após 15 análises com o mesmo BGE (C). Após 25 análises consecutivas. Condição de separação: 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenossulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido aminocaprílico, pH 4,5, injeção 50 mbar, 30 s, -30 kV, Capilar com 38,5 cm de comprimento total (30 cm efetivo), 75 µm diâmetro interno detecção: 210 nm.



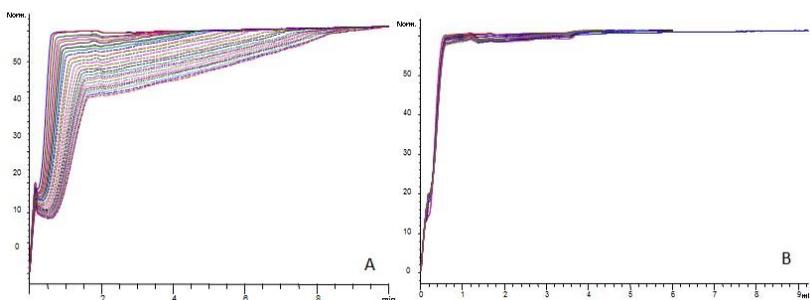
Fonte: Próprio autor

Essas variações podem ser justificadas pela ocorrência de eletrólise no BGE, que alteram a capacidade tamponante, modificando assim o pH. Essa mudança afeta diretamente as mobilidades dos analitos e seus tempos de migração, como observado acima na Figura 6.

Ao longo de 25 análises consecutivas sem a troca do BGE foi observado uma diminuição da corrente elétrica gerada no capilar (Figura 7), o que colabora na alteração do perfil de separação. Desta forma optou-se por utilizar um recipiente de BGE (*vial*) de maior volume, para minimizar os efeitos da eletrólise. Esta troca viabilizou a utilização do mesmo BGE durante 25 corridas sem a diminuição da corrente e sem

afetar a separação dos analitos. Portanto, para manter a precisão do método, o eletrólito de corrida foi colocado em um recipiente de 1,5 mL (ao invés de 750  $\mu\text{L}$ ) e trocado a cada 25 análises.

**Figura 7.** Gráfico da corrente gerada em 25 análises consecutivas. (A) Usando recipiente para BGE de 750  $\mu\text{L}$ . (B) Usando recipiente para o BGE de 1,5 mL. Condição de separação: 20 mmol  $\text{L}^{-1}$  de ácido benzenossulfônico e 45 mmol  $\text{L}^{-1}$  de ácido aminocaprílico, pH 4,5, injeção 50 mbar, 30 s, -30 kV, Capilar com 38,5 cm de comprimento total (30 cm efetivo), 75  $\mu\text{m}$  diâmetro interno detecção: 210 nm.



Fonte: Próprio autor

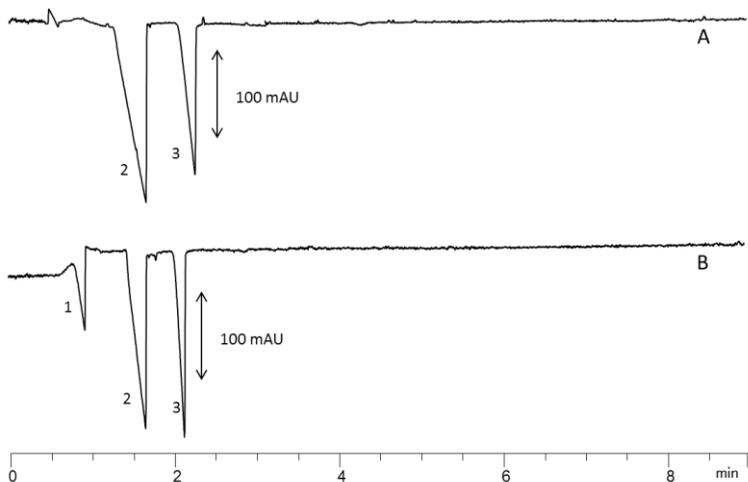
### 5.1.2 Estabilidade das soluções de sulfito

Durante as análises de soluções padrões de sulfito foi constatada a diminuição da área dos picos referentes ao sulfito, enquanto aumentava proporcionalmente a área de um novo pico, referente ao íon sulfato, identificado por meio de adição de padrão (Figura 8). Essa degradação ocorre porque agentes sulfitantes são compostos de grande reatividade, complicando suas análises quantitativas. Para contornar esse problema pode ser feita a conversão desses compostos em espécies mais estáveis, como o dióxido de enxofre, ou ainda utilizar soluções básicas ou ácidas para evitar sua oxidação (MACHADO; TOLEDO, 2006).

O pH de uma solução de sulfito de sódio em água foi acompanhado durante 3 horas, onde foi observado um decaimento significativo do pH, de 9,3 para 7,0. Foi estudado estabilizar o pH das soluções de sulfito com uma solução tampão alcalina na região de pH 9. Foram avaliadas duas soluções com boas capacidades tamponante TBS 5 mmol  $\text{L}^{-1}$  e amônio (hidróxido de amônio 40 mmol  $\text{L}^{-1}$  e MES 20

mmol L<sup>-1</sup>), ambas pH 9,3 para preparar soluções de sulfito e analisar suas estabilidades.

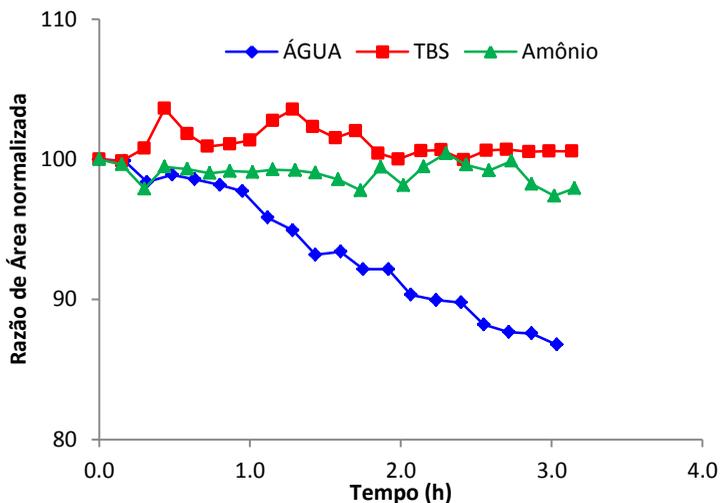
**Figura 8.** Eletroferogramas para testar estabilidade da solução padrão de sulfito 100 mg L<sup>-1</sup> e padrão interno malonato 20 mg L<sup>-1</sup> em TBS. (A) Primeira injeção. (B) Mesma solução após 40 injeções. Legenda: 1- Sulfato; 2- Sulfito e 3- malonato. Condição de separação: 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenossulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido aminocaprílico, pH 4,5, injeção 50 mbar, 30 s, -30 kV, Capilar com 38,5 cm de comprimento total (30 cm efetivo), 75 µm diâmetro interno detecção: 210 nm.



Fonte: Próprio autor

No gráfico abaixo (Figura 9) tem-se a comparação das análises de soluções de sulfito com padrão interno, preparadas com água deionizada, solução de amônio e TBS. Fica claro observando a figura que as soluções onde havia tampões para manter o pH em 9,3 não houve oxidação do sulfito, sendo observado a diminuição da área do sulfito apenas para a solução preparada com água deionizada. Apesar das duas soluções auxiliarem a manter estável o sulfito, optou-se por utilizar soluções de TBS com concentração final de 5 mmol L<sup>-1</sup> devido seu preparo ser mais simples.

**Figura 9.** Gráfico da razão de área normalizada versus tempo de injeção das soluções de padrões de sulfito com água, soluções tamponadas de TBS e amônio.



Fonte: Próprio autor

## 5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

### 5.2.1 Conformidade do sistema

Na Tabela 5 abaixo se encontram as respostas de CV dos ensaios de conformidade do sistema avaliados pelas áreas e tempos corrigidos pelo padrão interno.

**Tabela 5.** Respostas obtidas através de dez injeções consecutivas de uma solução de padrões dos analitos sulfito, citrato e fosfato com padrão interno malonato em concentração igual ao ponto central da curva de calibração.

Analito	Coeficiente de Variação* (%)	
	Área	Tempo
<b>Sulfito</b>	0,82	0,84
<b>Citrato</b>	0,77	0,89
<b>Fosfato</b>	0,68	0,76

(\*) Coeficiente de variação obtido pela equação:  $CV = (D / M) \times 100$ , em que D é o desvio padrão absoluto e M é a média aritmética das razões de áreas da substância a analisar pela área do padrão interno ou média aritmética do tempo de migração.

$n = 10$ ;

A AOAC (2016) considera apropriado valores de CV abaixo de 11% para amostras com concentrações na ordem de  $\text{mg L}^{-1}$ , portanto os resultados se encontram adequados pois apresentaram valores de inferiores 0,82% e 0,89% para área corrigida e tempo corrigido respectivamente.

### 5.2.2 Linearidade

Foram construídas curvas de calibração externa dos três analitos e mantendo o padrão interno constante ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ). A curva de calibração foi preparada em triplicata e injetada de forma aleatória. Primeiramente foram gerados gráficos de regressão linear para cada um dos compostos, cujos parâmetros encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6.** Resultados da linearidade das curvas de calibração externa das soluções padrão sulfito, citrato e fosfato.

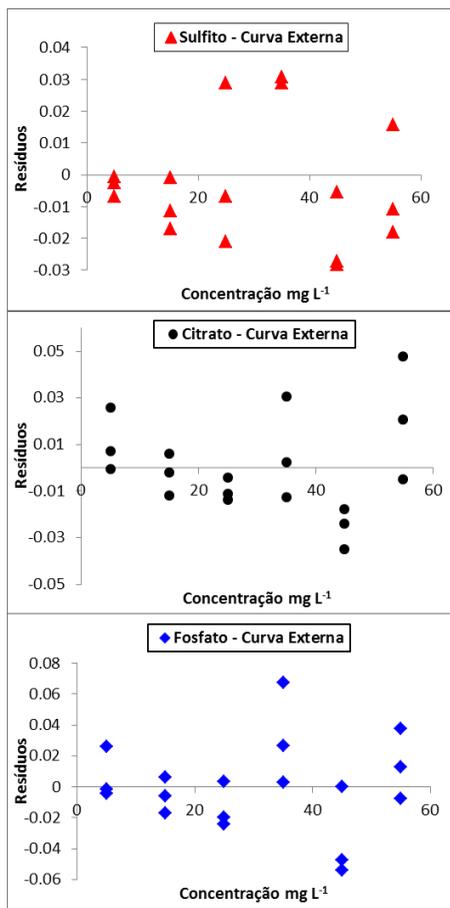
Parâmetros	Analitos		
	Sulfito	Citrato	Fosfato
Linearidade - Faixa de calibração ( $\text{mg L}^{-1}$ )*	5 - 55	5 - 55	5 - 55
Linearidade - Inclinação ( $\text{L mg}^{-1}$ )*	0,049	0,050	0,080
Desvio padrão - inclinação*	0,004	0,001	0,001
Linearidade-intercepto*	-0,095	-0,124	-0,110
Desvio padrão - intercepto*	0,031	0,020	0,016
Linearidade - coeficiente determinação ( $R^2$ )*	0,997	0,999	0,996

(\*) Curvas de calibração com seis níveis de concentração corrigidos pela área do padrão interno, cada ponto preparado em triplicata.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) das três curvas de calibração apresentaram valores superiores a 0,99, sendo considerado adequado segundo o INMETRO (2007).

A partir das curvas de calibração foram gerados gráficos de resíduos para verificação de possíveis valores discrepantes (*outliers*) e a confirmação desses foi realizada pelo teste de Grubbs.

**Figura 10.** Gráficos dos resíduos da regressão linear para curva externa de sulfito, citrato e fosfato.



Fonte: Próprio autor

É observado um padrão aleatório na distribuição dos resíduos das curvas de calibração externas, satisfazendo as pressuposições do método MMQO. Ainda foi aplicado o teste de Grubbs, que confirmou que não havia a presença de *outliers*.

A avaliação da premissa de distribuição normal dos resíduos da regressão linear foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk, cujos resultados estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Resultados de normalidade do teste Shapiro-Wilk da avaliação dos resíduos das regressões das curvas de calibração dos analitos sulfito, citrato e fosfato.

<b>Analito</b>	<b>W<sub>calculado</sub></b>	<b>W<sub>tabelado*</sub></b>	<b>Resultado teste de Hipótese</b>
<b>Sulfito</b>	0,904	0,897	$W_{cal} > W_{tab}$ , não rejeita $H_0$
<b>Citrato</b>	0,931	0,897	$W_{cal} > W_{tab}$ , não rejeita $H_0$
<b>Fosfato</b>	0,938	0,897	$W_{cal} > W_{tab}$ , não rejeita $H_0$

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

\* n = 18

A distribuição normal dos dados foi devidamente confirmada, pois  $W_{calculado}$  apresentou valores maiores que  $W_{tabelado}$  para os resíduos das regressões lineares dos três analitos (valor crítico  $W$ ,  $\alpha = 5\%$ ).

A homocedasticidade foi avaliada pelo teste de Cochran e suas respostas estão dispostas na Tabela 8 abaixo.

**Tabela 8.** Resultados de homocedasticidade do teste de Cochran para avaliação dos resíduos das regressões das curvas de calibração dos analitos sulfito, citrato e fosfato.

<b>Analito</b>	<b>C<sub>calculado</sub></b>	<b>C<sub>tabelado*</sub></b>	<b>Resultado teste de Hipótese</b>
<b>Sulfito</b>	0,476	0,616	$C_{cal} < C_{tab}$ , não rejeita $H_0$
<b>Citrato</b>	0,252	0,616	$C_{cal} < C_{tab}$ , não rejeita $H_0$
<b>Fosfato</b>	0,345	0,616	$C_{cal} < C_{tab}$ , não rejeita $H_0$

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

\* n = 18

A distribuição dos resíduos da regressão foi homogênea ao longo dos 6 níveis para as curvas dos três analitos, pois os valores de  $C_{calculado}$  foram menores que  $C_{tabelado}$ , demonstrando assim a homocedasticidade dos dados (valor crítico  $C$   $\alpha = 5\%$ ).

O teste de Durbin-Watson foi realizado para a avaliação da premissa de autocorrelação dos resíduos das regressões. A independência dos resíduos foi confirmada a partir dos valores calculados de Durbin-Watson ( $d_w$ ) 2,45; 1,35 e 2,23 para sulfito, citrato e fosfato respectivamente, que junto com os valores tabelados de Durbin Watson  $d_L = 1,03$  e  $d_U = 1,26$ , para  $n = 18$  e  $\alpha = 0,05$ , comprovaram estar de acordo com o teste, onde  $d_U < d_w \leq 4 - d_U$ .

Os resíduos das regressões do sulfito, citrato e fosfato seguiram as premissas de distribuição normal, homocedástica e independente, confirmando que a escolha do MMQO foi apropriada (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). Foi ainda confirmado o ajuste ao modelo linear através do teste F, uma vez que  $F_{\text{calculado}}$  é maior que  $F_{\text{tabelado}}$  pode-se afirmar que o modelo não possui falta de ajuste.

Dessa forma pode-se concluir que os modelos apresentados para os analitos são lineares nas faixas de trabalho proposta (5 – 55 mg L<sup>-1</sup>).

**Tabela 9.** Valores de F para verificação do ajuste ao modelo linear para curvas externas.

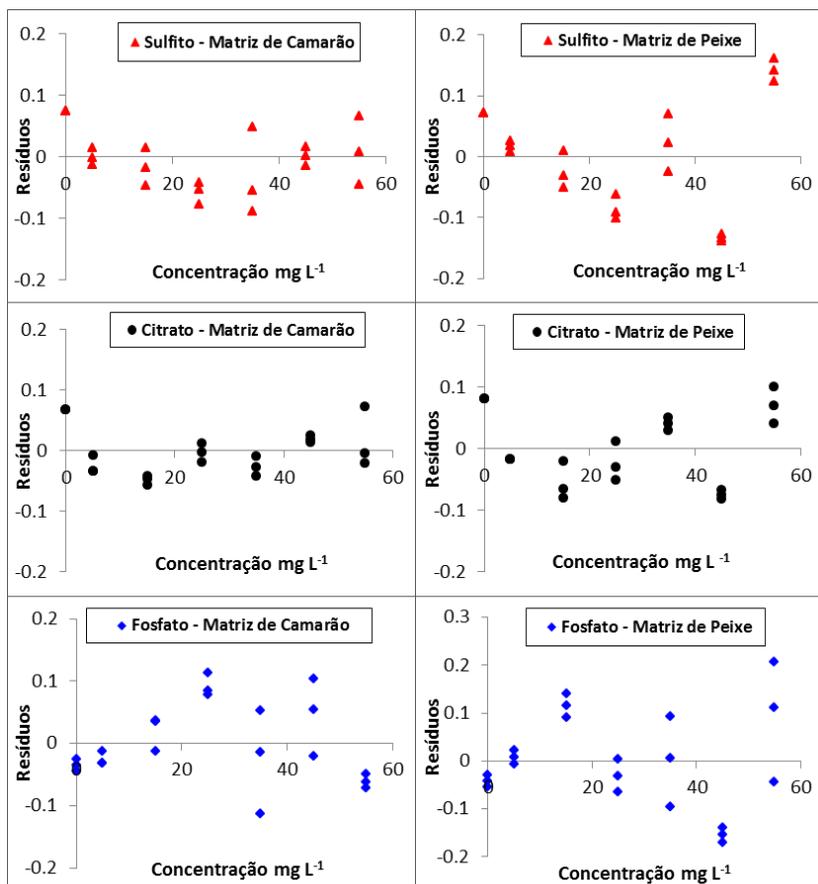
<b>Analito</b>	<b>F<sub>calculado</sub></b>	<b>F<sub>tabelado*</sub></b>
<b>Sulfito</b>	17909	4,49
<b>Citrato</b>	25925	4,49
<b>Fosfato</b>	29961	4,49

\* n = 18

### 5.2.3 Efeito de matriz

Para avaliar o efeito de matriz as curvas preparadas em amostra de camarão e de peixe receberam o mesmo tratamento que as curvas dos analitos em solução padrão. Foram gerados os gráficos de regressão linear e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos para a curva feita na matriz de amostra de camarão foram 0,998; 0,999 e 0,998 para sulfito, fosfato e citrato respectivamente, já para a curva feita com as amostras de peixes os valores de  $R^2$  foram 0,992; 0,996 e 0,997. O MMQO foi utilizado para calcular as estimativas dos parâmetros referentes à regressão. Os gráficos de resíduos obtidos das duas matrizes estão na Figura 11. Os valores discrepantes foram investigados pelo teste de Grubbs, onde não foi encontrado nenhum outlier, tendo os resíduos seguido uma distribuição normal segundo o teste de Shapiro-Wilk como pode ser visualizado na Tabela 10.

**Figura 11.** Gráficos dos resíduos da regressão linear para as curvas com adição de padrão na matriz de camarão e peixe.



Fonte: Próprio autor

**Tabela 10.** Valores do teste de Shapiro-Wilk pra verificar a distribuição normal dos resíduos das curvas de adição de padrão em matriz.

<b>Matriz</b>	<b>Analito</b>	<b>W<sub>calculado</sub></b>	<b>W<sub>tabelado*</sub></b>	<b>Resultado teste de Hipótese</b>
<b>Camarão</b>	<b>Sulfito</b>	0,917	0,908	$W_{cal} > W_{tab}$ , não rejeita $H_0$
	<b>Citrato</b>	0,916	0,908	
	<b>Fosfato</b>	0,913	0,908	
<b>Peixe</b>	<b>Sulfito</b>	0,909	0,908	$W_{cal} > W_{tab}$ , não rejeita $H_0$
	<b>Citrato</b>	0,911	0,908	
	<b>Fosfato</b>	0,933	0,908	

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

\* n = 21

A Tabela 11 mostra os resultados do teste de Cochran para os resíduos das curvas de adição de padrão em matriz. Os dados comprovaram ser homocedásticos para  $\alpha = 5\%$ .

**Tabela 11.** Valores do teste de Cochran pra verificar a homocedasticidade dos resíduos das curvas de adição de padrão em matriz.

<b>Matriz</b>	<b>Analito</b>	<b>C<sub>calculado</sub></b>	<b>C<sub>tabelado*</sub></b>	<b>Resultado teste de Hipótese</b>
<b>Camarão</b>	<b>Sulfito</b>	0,492	0,561	$C_{cal} < C_{tab}$ , não rejeita $H_0$
	<b>Citrato</b>	0,429	0,561	
	<b>Fosfato</b>	0,556	0,561	
<b>Peixe</b>	<b>Sulfito</b>	0,557	0,561	$C_{cal} < C_{tab}$ , não rejeita $H_0$
	<b>Citrato</b>	0,524	0,561	
	<b>Fosfato</b>	0,557	0,561	

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

\* n = 21

O teste de independência de Durbin-Watson apresentou para a curva em matriz de camarão valores de  $d_w = 1,33$  para o sulfito, 1,55 para o citrato e 1,38 para o fosfato, e em matriz de peixe os valores foram 1,92 para o sulfito, 1,35 para o citrato e 2,06 para o fosfato. Os valores de  $d_L = 1,10$  e  $d_U = 1,30$ , para  $n = 21$  e  $\alpha = 0,05$ , indicam que os resíduos são independentes.

A falta de ajuste também foi verificada para as curvas de adição de padrão na matriz, no qual, com o auxílio dos valores de  $F_{calculado}$  e  $F_{tabelado}$  concluiu-se que não há falta de ajuste.

**Tabela 12.** Valores de  $F$  para verificação do ajuste ao modelo linear para as curvas de adição de padrão em matriz.

<b>Matriz</b>	<b>Analito</b>	<b>F<sub>calculado</sub></b>	<b>F<sub>tabelado*</sub></b>
<b>Camarão</b>	<b>Sulfito</b>	7359	4,381
	<b>Citrato</b>	10896	4,381
	<b>Fosfato</b>	11167	4,381
<b>Peixe</b>	<b>Sulfito</b>	2059	4,381
	<b>Citrato</b>	4274	4,381
	<b>Fosfato</b>	3409	4,381

\* n = 21

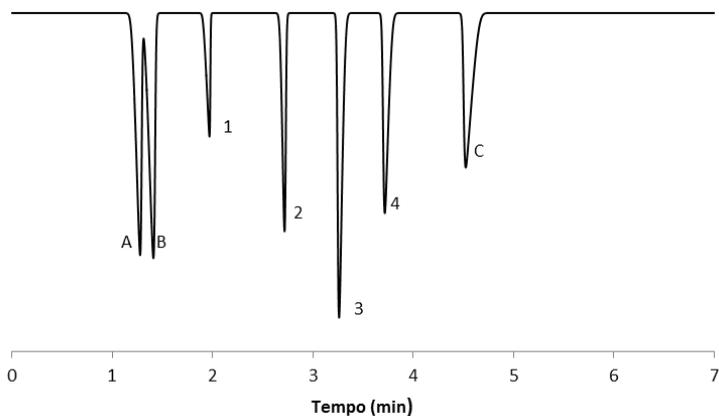
Para a inclinação do efeito de matriz comparou-se as inclinações das curvas preparadas em solução padrão e em matriz. As razões entre os coeficientes angulares das curvas externas e das curvas com matriz camarão foram: 0,91 para o sulfito, 0,99 para o citrato e 1,02 para o fosfato. As razões dos coeficientes angulares das curvas externas com as curvas na matriz de peixe foram: 1,05 para o sulfito, 1,04 para citrato e 1,07 para o fosfato. Esses valores estão de acordo com a faixa de aceitação indicada por Hoff et al. (2015) para curvas onde não ocorre efeito de matriz. Portanto as quantificações do sulfito, citrato e fosfato foram realizados com a utilização de curvas de calibração externa.

### 5.2.4 Seletividade

A avaliação da seletividade do método foi realizada simulando possíveis interferentes do método no *software PeakMaster*®. Os ânions cloreto, sulfato e lactato são compostos que estão presentes nas amostras de pescado e que podem causar interferências nas determinações dos analitos, por isso estes foram simulados juntamente com os analitos nas mesmas condições de separação do método (Figura 12).

O cloreto e o sulfato possuem mobilidade alta, e por isso possuem tempos de migração menor que o sulfito, o lactato possui um tempo de migração maior que o fosfato, o último pico do eletroferograma simulado. Com a simulação pode-se confirmar que no eletroferograma simulado os possíveis interferentes não comprometeram a separação determinação dos analitos.

**Figura 12.** Seletividade simulada no software PeakMaster®. Legenda: Analitos (1) sulfito; (2) malonato, P.I; (3) citrato; (4) fosfato. Interferentes (A) sulfato; (B) cloreto; (C) lactato. Condições de separação simuladas: 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenossulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ácido aminocapróico, pH 4,5; injeção 50 mbar por 30 s, -30 kV. Capilar com 38,5 cm de comprimento total (30 cm efetivo), 75 µm diâmetro interno detecção: 210 nm.



Fonte: Próprio autor

### 5.2.5 Precisão

A precisão foi aferida com soluções padrão do sulfito, citrato e fosfato em 3 níveis de concentrações e os resultados obtidos estão na Tabela 13 abaixo.

**Tabela 13.** Valores de precisão intra e inter-ensaio, avaliado em três níveis de concentração utilizando soluções padrão de sulfito, citrato e fosfato.

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Analito	Intra-ensaio* (CV%)		Inter-ensaio** (CV%)	
		Área	T <sub>migracão</sub>	Área	T <sub>migracão</sub>
5,0	Sulfito	0,22	0,41	2,92	0,83
	Citrato	0,04	0,46	1,84	1,07
	Fosfato	0,80	0,47	2,84	0,73
25,0	Sulfito	0,22	0,23	2,01	0,59
	Citrato	0,82	0,26	1,07	0,81
	Fosfato	0,27	0,26	1,61	0,48
55,0	Sulfito	0,69	0,15	2,45	0,45
	Citrato	0,31	0,21	0,52	0,48
	Fosfato	0,43	0,15	2,39	0,47

CV calculado com a área e tempo corrigido pelo padrão interno malonato. \* n = 9; \*\*n = 27

O intra-ensaio gerou coeficientes de variação inferiores á 0,82 para a área e 0,47 para o tempo. O inter-ensaio resultou em valores inferiores a 2,92 para a área e 1,07 para o tempo. Os resultados foram considerados adequados, pois a os valores de CV obtidos estavam abaixo de 11% como o recomendado pela AOAC(2016).

### 5.2.6 Exatidão

A exatidão do método foi medida pelo ensaio de recuperação com quantidades conhecidas de sulfito, citrato e fosfato adicionado em amostras de peixe e de camarão antes da extração. As respostas para o ensaio assim como as concentrações de padrões adicionados nas matrizes estão expostas na Tabela 14.

**Tabela 14.** Valores de recuperação de sulfito, citrato e fosfato obtido em três níveis de concentração adicionado as matrizes de camarão e peixe com o desvio padrão de cada medida.

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Matriz	Recuperação (%)		
		Sulfito	Citrato	Fosfato
35	Camarão	81,1±4,7	94,6±4,6	99,5±5,9
45		84,0±3,4	94,7±3,2	107,9±13,6
55		82,4±4,7	97,7±3,7	87,8±4,6
35	Peixe	80,7±6,2	95,9±4,2	102,3±15,0
45		83,5±3,5	98,7±2,4	107,8±9,6
55		81,2±4,4	94,0±9,0	95,1±16,9

Fonte: próprio autor.

Na amostra de camarão os valores de recuperação nos níveis de concentração selecionados variaram de 81,1% a 84,0% para o sulfito, 94,6% a 97,7% para o citrato e 87,8% a 107,9% para o fosfato. Para a amostra de peixe a variação para o sulfito foi 80,7% a 83,5%. Esses valores de recuperação dos analitos são considerados aceitáveis pela AOAC (2016) que estipula valores de recuperação entre 80% e 110%.

### 5.2.7 Limites de detecção e quantificação

Os valores de LD e LQ obtidos pela relação sinal/ruído dos eletroferogramas estão na tabela 15 onde se observa valores de LD abaixo de  $1,80 \text{ mg L}^{-1}$  de LQ abaixo de  $4,79 \text{ mg L}^{-1}$ .

**Tabela 15.** Valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) obtidos através da relação sinal/ruído dos eletroferogramas das separações dos analitos sulfito, citrato e fosfato.

<b>Analito</b>	<b>LD (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>	<b>LQ (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>
<b>Sulfito</b>	1,80	4,60
<b>Citrato</b>	1,43	4,79
<b>Fosfato</b>	1,15	3,88

Fonte: próprio autor.

### 5.2.8 Robustez

Para avaliar a robustez foi proposto um planejamento de experimento Box-Behnken com três fatores e três níveis com triplicata no ponto central (planejamento com quinze experimentos). Esse planejamento foi aplicado tanto em soluções padrão dos analitos quanto em amostra branca de peixe com adição de padrões, além disso, os experimentos foram realizados em dois capilares de diferentes fabricantes (fabricante A e fabricante B). Ao todo foram realizados 60 experimentos descritos na Tabela 16.

Os fatores utilizados para a verificação da robustez foram pH do BGE, porcentagem de solvente para a precipitação das proteínas, tempo de ultrassom da extração dos analitos e o fabricante dos capilares. O pH do BGE é um dos fatores determinantes na separação por eletroforese capilar, sendo que uma variação da concentração do ácido benzenossulfônico ou do ácido aminocaprílico pode ocorrer durante o preparo das soluções estoques ou durante o preparo do BGE. A precipitação proteica com solvente é uma etapa do preparo da amostra que garante a remoção de proteína na solução que será analisada,

evitando que se ligue a sílica do capilar e altere o EOF. O ultrassom foi utilizado na etapa de extração dos analitos, sendo esta fundamental para a correta determinação da concentração. A qualidade do capilar pode afetar o EOF e a separação dos analitos, e ao longo dos experimentos de pesquisa notou-se que para alguns métodos havia notável modificação na separação dos analitos quando se trocava o fabricante do capilar de sílica.

**Tabela 16.** Planejamento Box-Behnken com 3 fatores;  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  aplicado em dois capilares diferentes aplicados em solução padrão e amostra de peixe para avaliação da robustez do método.

<b>CAPILAR – FABRICANTE A</b>						
<b>Ensaio</b>	<b>Solução de Padrões</b>			<b>Matriz de peixe</b>		
	<b><math>X_1</math></b>	<b><math>X_2</math></b>	<b><math>X_3</math></b>	<b><math>X_1</math></b>	<b><math>X_2</math></b>	<b><math>X_3</math></b>
<b>1</b>	-1	-1	0	-1	-1	0
<b>2</b>	1	-1	0	1	-1	0
<b>3</b>	-1	1	0	-1	1	0
<b>4</b>	1	1	0	1	1	0
<b>5</b>	-1	0	-1	-1	0	-1
<b>6</b>	1	0	-1	1	0	-1
<b>7</b>	-1	0	1	-1	0	1
<b>8</b>	1	0	1	1	0	1
<b>9</b>	0	-1	-1	0	-1	-1
<b>10</b>	0	1	-1	0	1	-1
<b>11</b>	0	-1	1	0	-1	1
<b>12</b>	0	1	1	0	1	1
<b>13</b>	0	0	0	0	0	0
<b>14</b>	0	0	0	0	0	0
<b>15</b>	0	0	0	0	0	0

<b>CAPILAR – FABRICANTE B</b>						
<b>Ensaio</b>	<b>Solução de Padrões</b>			<b>Matriz de peixe</b>		
	<b><math>X_1</math></b>	<b><math>X_2</math></b>	<b><math>X_3</math></b>	<b><math>X_1</math></b>	<b><math>X_2</math></b>	<b><math>X_3</math></b>
<b>1</b>	-1	-1	0	-1	-1	0
<b>2</b>	1	-1	0	1	-1	0
<b>3</b>	-1	1	0	-1	1	0
<b>4</b>	1	1	0	1	1	0
<b>5</b>	-1	0	-1	-1	0	-1
<b>6</b>	1	0	-1	1	0	-1
<b>7</b>	-1	0	1	-1	0	1
<b>8</b>	1	0	1	1	0	1
<b>9</b>	0	-1	-1	0	-1	-1
<b>10</b>	0	1	-1	0	1	-1
<b>11</b>	0	-1	1	0	-1	1
<b>12</b>	0	1	1	0	1	1
<b>13</b>	0	0	0	0	0	0
<b>14</b>	0	0	0	0	0	0
<b>15</b>	0	0	0	0	0	0

Fatores:

$X_1$  - Tempo de ultrassom (min): (-1): 7,8; (0): 8,0; (1): 8,2;

$X_2$  - Porcentagem de ACN para precipitação de proteína (%): (-1): 62,0;  
(0): 67,0; (1): 72,0

$X_3$  - pH do BGE: (-1): 4,13; (0): 4,53; (1): 4,93.

As variações empregadas para esses fatores foram variações pequenas e passíveis de acontecer na rotina do laboratório, pois a robustez do método indica a capacidade que este tem de resistir a pequenas variações em seus parâmetros sem prejudicar a determinação dos analitos. Essas variações dos fatores do planejamento fatorial encontram-se na Tabela 17.

**Tabela 17.** Fatores e variações para avaliação do parâmetro robustez do método para determinação de sulfito, citrato e fosfato em amostras de pescado.

<b>Fatores</b>	<b>Condição</b>	<b>Varição</b>
<b>pH</b>	4,5	0,4
<b>% ACN</b>	67	5
<b>Tempo de ultrassom (min)</b>	8	0,2
<b>Capilar</b>	Fabricante A	Fabricante B

Fonte: próprio autor.

Ao contrário de outros métodos de avaliação de robustez, como o teste de Youden (YOU DEN, 1975), não foram avaliadas variações experimentais do equipamento como, voltagem aplicada na separação, pressão da injeção, temperatura e comprimento de onda, pois esse tipo de variação é difícil de ocorrer, uma vez que o sistema de eletroforese capilar é completamente automatizado, variações desses parâmetros ocorrem raramente e indicam um problema de funcionamento do equipamento e não a falta de robustez do método.

As respostas do ensaio da robustez foram dadas pelo valor de CRS, uma função que considera a resolução de todos os pares de picos simultaneamente, além disso, foi realizada a análise visual dos eletroferogramas. Devida a grande quantidade de dados gerados, será exposta na discussão apenas uma parte, os dados completos estão expostos nos apêndices A, B, C e D.

Quanto menor o valor calculado de CRS melhor é a resposta, mais próximo do valor ideal de resolução se encontra (PRADO; PORTO; OLIVEIRA, 2017). Os valores calculados de CRS dos quatro planejamentos estão na Tabela 18. Esses dados mostraram que a variação do pH do BGE afetou a resolução. Os valores de CRS crescem tanto com o aumento do pH para 4,9 quanto com a diminuição do pH para 4,1. Porém, o aumento do pH para 4,9 acarretou um acréscimo maior no CRS do que para pH 4,1.

**Tabela 18.** Resultados de CRS obtidos nas 60 condições analíticas para avaliação da robustez.

<b>CAPILAR – FABRICANTE A</b>								
<b>Ensaio</b>	<b>Solução de Padrões</b>				<b>Matriz de peixe</b>			
	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>CRS</b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>CRS</b>
<b>1</b>	-1	-1	0	1,28	-1	-1	0	1,06
<b>2</b>	1	-1	0	1,37	1	-1	0	1,20
<b>3</b>	-1	1	0	1,42	-1	1	0	1,14
<b>4</b>	1	1	0	1,75	1	1	0	1,58
<b>5</b>	-1	0	-1	3,32	-1	0	-1	3,18
<b>6</b>	1	0	-1	4,01	1	0	-1	4,82
<b>7</b>	-1	0	1	15,31	-1	0	1	11,38
<b>8</b>	1	0	1	16,42	1	0	1	15,28
<b>9</b>	0	-1	-1	3,55	0	-1	-1	3,53
<b>10</b>	0	1	-1	3,90	0	1	-1	3,63
<b>11</b>	0	-1	1	14,23	0	-1	1	10,24
<b>12</b>	0	1	1	10,40	0	1	1	13,29
<b>13</b>	0	0	0	1,76	0	0	0	1,63
<b>14</b>	0	0	0	1,42	0	0	0	1,31
<b>15</b>	0	0	0	1,52	0	0	0	1,26

<b>CAPILAR – FABRICANTE B</b>								
<b>Ensaio</b>	<b>Solução de Padrões</b>				<b>Matriz de peixe</b>			
	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>CRS</b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>CRS</b>
<b>1</b>	-1	-1	0	1,25	-1	-1	0	1,05
<b>2</b>	1	-1	0	1,31	1	-1	0	1,13
<b>3</b>	-1	1	0	1,38	-1	1	0	1,23
<b>4</b>	1	1	0	1,88	1	1	0	1,67
<b>5</b>	-1	0	-1	3,79	-1	0	-1	4,01
<b>6</b>	1	0	-1	4,50	1	0	-1	5,65
<b>7</b>	-1	0	1	10,04	-1	0	1	8,29
<b>8</b>	1	0	1	18,85	1	0	1	12,51
<b>9</b>	0	-1	-1	3,45	0	-1	-1	4,69
<b>10</b>	0	1	-1	4,00	0	1	-1	3,96
<b>11</b>	0	-1	1	11,07	0	-1	1	9,72
<b>12</b>	0	1	1	12,29	0	1	1	10,60
<b>13</b>	0	0	0	1,55	0	0	0	1,31
<b>14</b>	0	0	0	1,69	0	0	0	1,36
<b>15</b>	0	0	0	1,37	0	0	0	1,70

Fatores:

X<sub>1</sub> - Tempo de ultrassom (min): (-1): 7,8; (0): 8,0; (1): 8,2;X<sub>2</sub> - Porcentagem de ACN para precipitação de proteína (%): (-1): 62,0; (0): 67,0; (1): 72,0X<sub>3</sub> - pH do BGE: (-1): 4,13; (0): 4,53; (1): 4,93.

O aumento do CRS ocorre devido aos problemas na separação dos analitos, que são evidenciados nos eletroferogramas dos ensaios (figura 13). Os eletroferogramas correspondentes aos ensaios 7, 8, 11 e 12 com pH de 4,9 mostram que ocorre comigração do pico do sulfito com o do malonato além de um aumento do tempo de migração do sulfito e do tempo total da análise. Nos eletroferogramas dos ensaios 5, 6, 9 e 10 com pH 4,1 foi observada e comprovada com adição de padrão, que ocorre uma inversão da ordem de migração com os picos dos analitos citrato e fosfato, além da diminuição do tempo total de análise. Devida a baixa resolução entre esses analitos quando invertem suas posições, ocorreu comigração dos mesmos no ensaio 5.

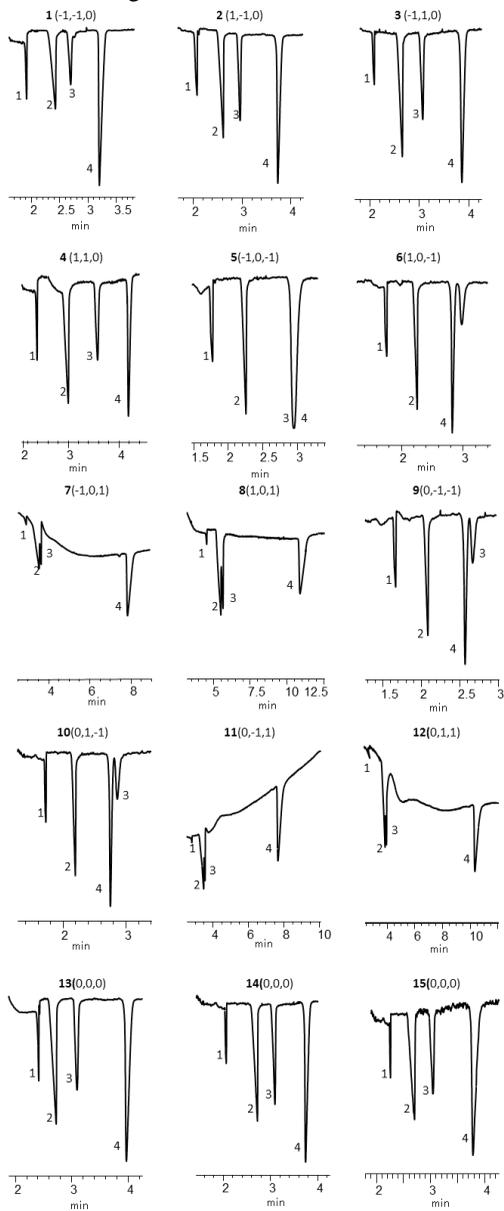
Essa mudança na resolução e no tempo de migração dos analitos ocorre por causa da alteração da mobilidade devido a variação do pH.

**Tabela 19.** Variação das mobilidades dos analitos em função do pH, dados obtidos do PeakMaster® software.

pH	Mobilidade efetiva ( $\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ )			
	Sulfito	Malonato	Citrato	Fosfato
4,1	-46,3	-35,1	-27,4	-29,8
4,5	-46,5	-36,8	-32,4	-30,0
4,9	-46,7	-39,4	-38,0	-30,2

Os dados da mobilidade obtidos do *software* PeakMaster® (Tabela 17) deixam evidente que uma variação de 0,4 no pH prejudica a separação e a ordem de migração dos analitos. Porém, ao preparar os eletrólitos para os ensaios percebeu-se que uma variação de 0,4 não era uma variação pequena. Para chegar nesses pHs foi necessário utilizar altas quantidades dos componentes do BGE, muito além da quantidade usual para se chegar no pH 4,5, o que caracterizaria um erro grosseiro do analista.

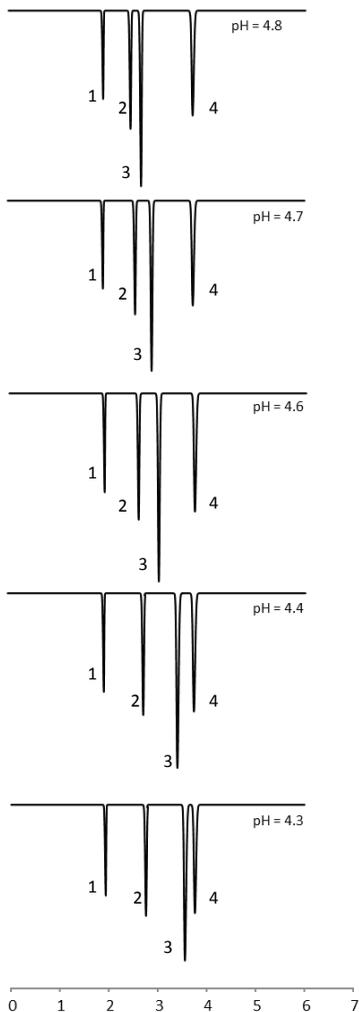
**Figura 13.** Eletroferogramas dos 15 ensaios realizados em solução padrão e capilar do fabricante A. Legenda: 1-sulfito; 2-malonato; 3-citrato e 4-fosfato.



Fonte: Próprio autor

Sabendo que uma ampla variação na faixa de pH resulta no comprometimento da análise, foi verificado os limites dessa variação com o auxílio do *software* PeakMaster® para simular variações menores do pH, uma vez que o software foi capaz de simular corretamente a variação de 0,4 pH como mostrado na Tabela 19.

**Figura 14.** Eletroferogramas simulados para variação de pH, para avaliação da robustez.



Fonte: Próprio autor

A análise dos eletroferogramas simulados mostra que a variação de pH 4,4 até pH 4,7 não ocorre comprometimento da resolução, sendo assim essa pequena variação não prejudicaria a separação dos analitos.

O aumento do CRS e a alteração nos eletroferogramas foram observados apenas para a variação do pH, as variações do tempo de ultrassom e da porcentagem do solvente para precipitar a proteína não afetaram significativamente a separação. Essa afirmação é evidenciada quando se mantém o pH constante e varia um dos outros dois fatores estudados, nota-se que não há alterações pronunciadas nos valores de CRS devido a modificação desses dois fatores. Portanto, é possível afirmar que pequenas alterações (na faixa avaliada) não prejudicam o método.

A utilização de capilares de fabricantes diferentes também não alterou a separação dos analitos para o método proposto, o perfil de resposta de CRS observado para o fabricante A é o mesmo observado para o fabricante B.

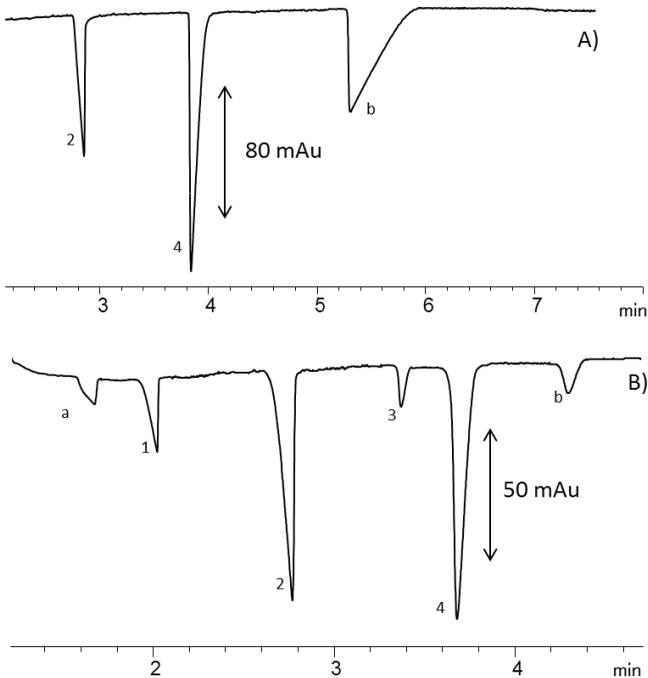
O método provou ser robusto para a variação da porcentagem de acetonitrila utilizado para a precipitação de proteínas; para a variação do tempo de extração no ultrassom e em pequenas variações de pH. Variações de pH acima de 4,7 e abaixo de 4,4 não são recomendados pois prejudicam a separação dos analitos.

### 5.3 DETERMINAÇÃO DE SULFITO, CITRATO E FOSFATO EM AMOSTRAS DE PESCADO

Depois de ser validado o método, foram analisadas 24 amostras de pescado a fim de demonstrar a aplicabilidade do método. Foram analisadas 9 amostras de camarão e 15 amostras de diferentes tipos de peixes. As amostras foram preparadas em triplicata do preparo e as concentrações dos aditivos encontrados nas amostras estão apresentados na Tabela 20 e alguns dos eletroferogramas estão na Figura 15.

Os eletroferogramas das amostras mantiveram o perfil semelhante aos eletroferogramas com solução de padrões e independente do tipo de amostra. A presença de analitos sulfito, citrato e fosfato foram confirmadas através de adição de padrão assim como outros ânions presentes nas amostras como o sulfato e o lactato.

**Figura 15.** Eletroferogramas das amostras empregando o método validado. A) eletroferograma da amostra de alabote. B) Eletroferograma da amostra de camarão. Legenda: 1 - sulfito, 2 - malonato, 3- citrato, 4- fosfato, a-sulfato e b-lactato. Condições de separação: 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido benzenossulfônico e 45 mmol L<sup>-1</sup> de ácido aminocaprílico, pH 4,5, injeção 50 mbar, 30 s, -30 kV, capilar com 38,5 cm de comprimento total (30 cm efetivo), 75 µm diâmetro interno detecção: 210 nm.



Fonte: Próprio autor.

**Tabela 20.** Resultados da quantificação de sulfito, citrato e fosfato, com o desvio padrão de cada resposta para amostras de peixe e camarão pelo método proposto por eletroforese capilar de zona com.

Amostra	Concentração (g/100g)		
	Sulfito (expresso como SO <sub>2</sub> )*	Citrato	Fosfato
<b>Camarão 1</b>	0,0141±0,0022	<LD	0,1194±0,0063
<b>Camarão 2</b>	0,0061±0,0003	0,0125±0,0005	0,0854±0,0061
<b>Camarão 3</b>	0,0071±0,0023	0,0131±0,0003	0,1042±0,0083
<b>Camarão 4</b>	0,0058±0,0003	0,0144±0,0004	0,0963±0,0054
<b>Camarão 5</b>	0,0060±0,0011	0,0211±0,0031	0,1537±0,0060
<b>Camarão 6</b>	<LD	<LD	0,0709±0,0156
<b>Camarão 7</b>	0,0077±0,0004	0,0260±0,0008	0,0866±0,0079
<b>Camarão 8</b>	0,0138±0,0026	<LD	0,2417±0,0351
<b>Camarão 9</b>	0,0090±0,0002	<LD	0,2237±0,0065
<b>Abrótea</b>	0,0188±0,0007	<LD	0,1793±0,0091
<b>Alabote</b>	<LD	<LD	0,3472±0,0115
<b>Atum</b>	<LD	<LD	0,6327±0,0170
<b>Cação</b>	<LD	<LD	1,2749±0,0635
<b>Corvina</b>	<LD	<LD	0,3846±0,0273
<b>Linguado</b>	<LD	<LD	0,3144±0,0232
<b>Misturinha</b>	<LD	<LD	0,1540±0,0078
<b>Namorado</b>	<LD	<LD	0,4727±0,0406
<b>Pescada</b>	0,0206±0,0002	<LD	0,1627±0,0076
<b>Polaca do Alasca</b>	<LD	<LD	0,1436±0,0041
<b>Salmão</b>	0,0199±0,0004	<LD	0,4601±0,0274
<b>Sardinha</b>	<LD	<LD	0,4371±0,0193
<b>Tainha</b>	<LD	<LD	0,3515±0,0097
<b>Tilápia comercial</b>	<LD	<LD	0,3305±0,0298
<b>Tilápia branca</b>	<LD	<LD	0,1005±0,0176

\*Valor de sulfito convertido para o valor correspondente de SO<sub>2</sub>.

Fonte: Próprio autor.

As concentrações de sulfito foram convertidas para concentrações de dióxido de enxofre para atender a legislação brasileira, que determina que o teor máximo de SO<sub>2</sub> residual em camarões crus seja de 0,01g por 100 g de camarão (BRASIL, 1988). Nas amostras de camarão, apenas a amostra 6 não foi detectado sulfito. Essa resposta já era esperada, pois a amostra foi adquirida dos laboratórios de aquicultura da UFSC e não haviam sido adicionados aditivos nela. Com exceção das amostras 1 e 8 de camarão, todas as outras estavam com concentração de sulfito dentro do limite exigido. Além disso, foi encontrado sulfito em peixes, nas amostras de abrótea, pescada e salmão. Esse aditivo não costuma ser utilizado em peixes, e a legislação brasileira estipula que dentre os pescados, este seja utilizado em camarões e lagostas. Um dos motivos para a presença de sulfito pode ser a forma de exposição e armazenamento dos peixes pelos comerciantes. As amostras que apresentaram sulfito foram adquiridas de peixarias locais onde os filés de peixes estavam expostos ao lado de camarões e lagostas, o que pode ter ocasionado uma possível contaminação. Outro motivo para o aparecimento de sulfito em peixe pode ser o uso indiscriminado do aditivo pelos produtores ou comerciantes.

O citrato não é mencionado na legislação como um aditivo para pescado, porém este foi encontrado em 5 amostras de camarão, em concentração semelhantes as do sulfito e do fosfato. Esse resultado mostra a importância de rever a legislação quanto aos aditivos que podem ser utilizados no pescado e as concentrações que devem ser empregadas.

Fosfatos foram encontrados nas 24 amostras analisadas, inclusive nas amostras brancas, pois o fosfato existe naturalmente no pescado. Entretanto a legislação estipula um valor máximo de 0,50 g por 100 g de pescado. Apenas duas das amostras apresentaram valores acima do permitido, que foram as amostras de cação e atum. A legislação permite que seja utilizado tanto ortofosfato quanto polifosfato para conservar o pescado, entretanto o método desenvolvido é capaz de determinar a concentração de ortofosfatos apenas. Para a determinação de fosfato total por esse método pode ser realizada uma reação para decomposição dos polifosfatos em ortofosfato dessa forma o método proporcionará a concentração de todas as espécies de fosfato presente na amostra (TENHET et al., 1981).

Os métodos oficiais utilizados no controle de fosfato e sulfito são laboriosos (Anexo A) que possuem diversas etapas onde são utilizados diversos reagentes tóxicos e/ou corrosivos em grandes quantidades, sendo um possível risco para o analista e o meio ambiente quando os resíduos

não são tratados adequadamente. As inúmeras etapas dos dois métodos fazem com que esses possuam uma baixa frequência analítica, o que afeta rotina e a entrega de resultados nos laboratórios de fiscalização. Dentre os métodos propostos na literatura não consta nenhum onde é possível determinar simultaneamente os aditivos citrato, sulfito e fosfato em pescado. Logo, o método proposto mostra-se uma ferramenta alternativa interessante aos métodos atualmente empregados para o controle de aditivos em pescado.



## 6 CONCLUSÃO

Os softwares *PeakMaster* e *SIMULSC* foram fundamentais no desenvolvimento do método, suas utilizações permitiram otimizar a composição do eletrólito de corrida e dos parâmetros de separação do método cujas respostas experimentais estavam de acordo com as respostas simuladas.

A avaliação da durabilidade do eletrólito de corrida ao longo das corridas permitiu verificar as alterações ocorridas na separação, por isso optou-se utilizar recipientes de eletrólito de corrida (vials) de maior volume e manter o mesmo eletrólito durante 25 corridas consecutivas, para minimizar os efeitos da eletrólise sofrida pelo BGE.

O método de CZE foi validado e demonstrou bons resultados para os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez de acordo com os órgãos reguladores. Confirmando a eficácia do método e sua aplicabilidade para a determinação de sulfito, citrato e fosfato em pescado.

O método proposto foi capaz de separar três aditivos, citrato, fosfato e sulfito em tempo inferior a quatro minutos. Apresentando-se como um método viável para o controle desses aditivos no pescado.

Na análise de 24 amostras de pescado duas amostras de camarão apresentaram teores de sulfito acima do permitido pela legislação brasileira (0,01 g por 100 g de camarão cru) e duas amostras de peixe, atum e cação, continham fosfato acima da concentração permitida de 0,5 g por 100 g de pescado. O citrato foi encontrado em cinco amostras de camarão, mesmo esse aditivo não estando descrito na legislação para o uso em camarões.

A análise das amostras comprova a importância do constante monitoramento desses aditivos no pescado, para garantir que não haja fraude econômica e que não afete a saúde de quem consome esses produtos.



## REFERÊNCIAS

ABABOUC, L. Fisheries and Aquaculture topics. Composition of fish. Topics Fact Sheets. **FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome: FAO, 2005.**

AHMED, E. M. et al. Effects of salt, tripolyphosphate and sodium alginate on the texture and flavor of fish patties prepared from minced sheepshead. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 4, p. 1078–1080, 1983.

ALAMO, L. S. T.; TANGKUARAM, T.; SATIENPERAKUL, S. Determination of sulfite by pervaporation-flow injection with amperometric detection using copper hexacyanoferrate-carbon nanotube modified carbon paste electrode. **Talanta**, v. 81, n. 4, p. 1793–1799, 2010.

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

BRASIL. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova a revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III e VII, todas do Decreto n.º 55.871, de 26 de março de 1965 Title. **Diário Oficial da União**, 1988.

BRASIL. Plano Safra - Pesca e aquicultura/2015 - 2016. p. 117, 2015a.

BRASIL. **Aquicultura tem potencial para dobrar produção em cinco anos.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/06/aquicultura-tem-potencial-para-dobrar-producao-em-cinco-anos>>. Acesso em: 7 mar. 2017b.

BRASIL. RIISPOA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**., p. 80, 2017.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aditivos Alimentares – definições, classificações e emprego.**, 1997.

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

CÉSAR, I. DA C.; PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, p. 235–240, 2009.

COCHRAN, W. G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. **Annals of Human Genetics**, v. 11, n. 1, p. 47–52, 1941.

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

CONNELL, J. J. **Control of fish quality**. [s.l.] Fishing News Books Ltd, 1980.

COOPER, P. L. et al. Ion chromatography for determining residual sulfite on shrimp. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 4, p. 924–928, 1986.

CUI, H.; CAI, F.; XU, Q. Determination of tripolyphosphate in frozen cod and scallop adductor by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 884, n. 1, p. 89–92, 2000.

DAFFLON, O. et al. Polyphosphate determination in seafood and processed cheese using high-performance anion exchange chromatography after phosphatase inhibition using microwave heat shock. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v. 94, n. 2, p. 127–135, 2003.

DE OLIVEIRA SARTORI, A. G.; AMANCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança alimentar e nutricional**, v. 19, n. 2, p. 83–93, 2012.

DE SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A PRODUCE TO ASSESS LINERITY BY ORDINARY LEAST SQUARES METHOD. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 25–35, 2005.

DE SOUZA FERREIRA, S. V. C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. 2007.

DOLZAN, M. D. et al. A fast method for simultaneous analysis of methyl, ethyl, propyl and butylparaben in cosmetics and pharmaceutical

formulations using capillary zone electrophoresis with UV detection. **Analytical Methods**, v. 5, n. 21, p. 6023–6029, 2013.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression. II. **Biometrika**, v. 38, n. 1–2, p. 159–178, 1951.

DUŠEK, M. et al. Isotachophoretic determination of added phosphate in meat products. **Meat science**, v. 65, n. 2, p. 765–769, 2003.

ELLINGER, R. H. Phosphates in food processing. **Handbook of food additives**, v. 1, p. 617–780, 1972.

ERDOGDU, F. et al. Cook-related yield loss for pacific white (*Penaeus vannamei*) shrimp previously treated with phosphates: effects of shrimp size and internal temperature distribution. **Journal of Food Engineering**, v. 64, n. 3, p. 297–300, 2004.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. p. 200, 2016.

FAVERO, D. M.; RIBEIRO, C. DA S. G.; DE AQUINO, A. D. Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população. **Segurança alimentar e nutricional**, v. 18, n. 1, p. 11–20, 2011.

GAUCHERON, F. et al. Determination of anions of milk by ion chromatography. **Le Lait**, v. 76, n. 5, p. 433–443, 1996.

GONCALVES, A. A.; RIBEIRO, J. L. D. Do phosphates improve the seafood quality? Reality and legislation. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 3, n. 3, p. 237–247, 2008.

GRANATO, D.; DE ARAÚJO CALADO, V. M.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137–149, 2014.

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

HAARD, N. F.; SIMPSON, B. K. **Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality**. [s.l.] CRC Press, 2000.

HARDISSON, A. et al. Content of sulphite in frozen prawns and shrimps. **Food control**, v. 13, n. 4, p. 275–279, 2002.

HIKIMA, S.; HASEBE, K.; TAGA, M. New amperometric biosensor for citrate with mercury film electrode. **Electroanalysis**, v. 4, n. 8, p. 801–803, 1992.

HOFF, R. B. et al. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v. 132, p. 443–450, 2015.

HOLDEN, A. J.; LITTLEJOHN, D.; FELL, G. S. Determination of citrate in plasma protein solutions by UV-visible spectrophotometry and ion chromatography. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 14, n. 6, p. 713–719, 1996.

HUND, E. et al. Derivation of system suitability test limits from a robustness test on an LC assay with complex antibiotic samples. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 30, n. 4, p. 1197–1206, 2002.

IAMMARINO, M. et al. Development of a new analytical method for the determination of sulfites in fresh meats and shrimps by ion-exchange chromatography with conductivity detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 672, n. 1, p. 61–65, 2010.

INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial**, p. 25, 2007.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. **Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial**, p. 20, 2011a.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. **Inmetro**, p. 20, 2011b.

ISAAC, A. et al. Electroanalytical methods for the determination of sulfite in food and beverages. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 589–598, 2006.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de c??tions por eletroforese capilar: Fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363–373, 2001.

JASTRZEBSKA, A. Capillary isotachopheresis as rapid method for determination of orthophosphates, pyrophosphates, tripolyphosphates and nitrites in food samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1049–1056, 2011.

JASTRZEBSKA, A.; HOL, A.; SZŁYK, E. Simultaneous and rapid determination of added phosphorus (V) compounds in meat samples by capillary isotachopheresis. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 2097–2103, 2008.

KAUFMANN, A. et al. Analysis of polyphosphates in fish and shrimps tissues by two different ion chromatography methods: Implications on false-negative and-positive findings. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 11, p. 1073–1082, 2005.

KILINC, B. et al. Microbiological, chemical, sensory, color, and textural changes of rainbow trout fillets treated with sodium acetate, sodium lactate, sodium citrate, and stored at 4 C. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 18, n. 1–2, p. 3–17, 2009.

LANDERS, J. P. **Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**. [s.l.] CRC press, 2007.

LARMOND, E. **Laboratory methods for sensory evaluation of food**. [s.l.] Research Branch, Canada Dept. of Agriculture, 1977.

LEAF, A. Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 8, p. S27–S29, 2007.

LEE, A.; WHITESIDES, G. M. Analysis of inorganic polyphosphates by capillary gel electrophoresis. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 16, p. 6838–6846, 2010.

LINDGREN, M.; CEDERGREN, A.; LINDBERG, J. Conditions for sulfite stabilization and determination by ion chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 141, p. 279–286, 1982.

MACA, J. V.; MILLER, R. K.; ACUFF, G. R. Microbiological, Sensory and Chemical Characteristics of Vacuum-Packaged Ground Beef Patties Treated with Salts of Organic Acids. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 3, p. 591–596, 1997.

MACCALLUM, W. A. et al. Polyphosphate treatment of frozen cod. 2. Effect on drip, yield, lipid hydrolysis and protein extractability in twice-frozen Newfoundland summer trap and fall cod. **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 21, n. 3, p. 539–548, 1964.

MACHADO, R. M. D.; TOLEDO, M. C. F. Sulfitos em Alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 265–275, 2006.

MAPA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 25, DE 2 DE JUNHO DE 2011**, 2011.

MCFEETERS, R. F.; BARISH, A. O. Sulfite analysis of fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet spectrophotometric detection. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1513–1517, 2003.

MICHIGAMI, Y.; MOROOKA, M.; UEDA, K. Determination of sulphite and sulphate by ion chromatography using a weakly basic phthalate eluent. **Journal of Chromatography A**, v. 732, n. 2, p. 403–407, 1996.

MICKE, G. A. **Otimização e simulação em Eletroforese Capilar**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2004.

MUÑOZ, J. A.; LÓPEZ-MESAS, M.; VALIENTE, M. Development and validation of a simple determination of urine metabolites (oxalate, citrate, uric acid and creatinine) by capillary zone electrophoresis. **Talanta**, v. 81, n. 1, p. 392–397, 2010.

NUNES, C. A. et al. The use of statistical software in food science and technology: Advantages, limitations and misuses. **Food Research International**, v. 75, p. 270–280, 2015.

PIÑERO, M.; BAUZA, R.; ARCE, L. Thirty years of capillary electrophoresis in food analysis laboratories: Potential applications. **Electrophoresis**, v. 32, n. 11, p. 1379–1393, 2011.

PRADO, T. L. A.; PORTO, B. L. S.; OLIVEIRA, M. A. L. Method optimization for trans fatty acid determination by CZE-UV under direct detection with a simple sample preparation. **Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 958–965, 2017.

RAZZAQUE, M. S. Phosphate toxicity: new insights into an old problem. **Clinical science**, v. 120, n. 3, p. 91–97, 2011.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 2004.

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

ROEHR, C. C. et al. Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 34, n. 10, p. 1534–1541, 2004.

SAMPAIO, G. R.; LOBÃO, V. L.; ROCCO, S. C. Uso de fosfatos como aditivos alimentares na redução de exsudato e nos atributos sensoriais da carne do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*. **Boletim do Instituto de Pesca. São Paulo**, p. 97–107, 2001.

SCAMPICCHIO, M. et al. Determination of sulfite in wine by linear sweep voltammetry. **Electroanalysis**, v. 20, n. 4, p. 444–447, 2008.

SCHLABACH, T. D.; EXCOFFIER, J. L. Multi-variate ranking function for optimizing separations. **Journal of Chromatography A**, v. 439, n. 2, p. 173–184, 1988.

SEKIGUCHI, Y. et al. Analysis of condensed phosphates in food products by ion chromatography with an on-line hydroxide eluent generator. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1, p. 639–644, 2000.

SHAMSI, S. A.; DANIELSON, N. D. Individual and simultaneous class separations of cationic and anionic surfactants using capillary electrophoresis with indirect photometric detection. **Analytical chemistry**, v. 67, n. 22, p. 4210–4216, 1995.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591, 1965.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. The binomial distribution. **Statistical Methods. Iowa State University Press, Ames**, p. 117–120, 1989.

SOARES, V. F. M. et al. HISTAMINE LEVELS AND PHYSICO-CHEMICAL AND SENSORY QUALITY OF FROZEN FISH FILLET. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 18, n. 4, p. 462–470, 1998.

SPUDEIT, D. A. et al. A Systematic Procedure to Develop a Capillary Electrophoresis Method Using a Minimal Experimental Data. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 11, p. 1974–1979, 2016.

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

STEVENS, K. K. **Phosphate as a cardiovascular risk factor: effects on vascular and endothelial function**. [s.l.] University of Glasgow, 2014.

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

TAVARES, M. F. M. **Mecanismos de separação em eletroforese capilar** *Química Nova*, 1997.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. **Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2004.

TAYLOR, S. L. et al. Sensitivity to sulfited foods among sulfite-sensitive subjects with asthma. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 81, n. 6, p. 1159–1167, 1988.

TAYLOR, S. L.; HIGLEY, N. A.; BUSH, R. K. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. **Advances in food research**, v. 30, p. 1–76, 1986.

TENHET, V. et al. Phosphorous levels in peeled and deveined shrimp treated with sodium tripolyphosphate. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 2, p. 350–352, 1981.

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

TRENERRY, V. C. The determination of the sulphite content of some foods and beverages by capillary electrophoresis. **Food chemistry**, v. 55, n. 3, p. 299–303, 1996.

VALLY, H.; THOMPSON, P. J. Role of sulfite additives in wine induced asthma: single dose and cumulative dose studies. **Thorax**, v. 56, n. 10, p. 763–769, 2001.

VITALI, L. Preparação, caracterização e aplicação de capilares modificados com quitosana e sal de quitosana quaternizada em eletroforese capilar. 2012.

VITALI, L. et al. Development of a fast and selective separation method to determine histamine in tuna fish samples using capillary zone electrophoresis. **Talanta**, v. 106, p. 181–185, 2013.

WANG, L.; LI, J.; ZHANG, L. Determination of polyphosphates in fish and shrimp muscles by capillary electrophoresis with indirect UV detection after phosphatase inhibition using high pressure pretreatment. **Food chemistry**, v. 185, p. 349–354, 2015.

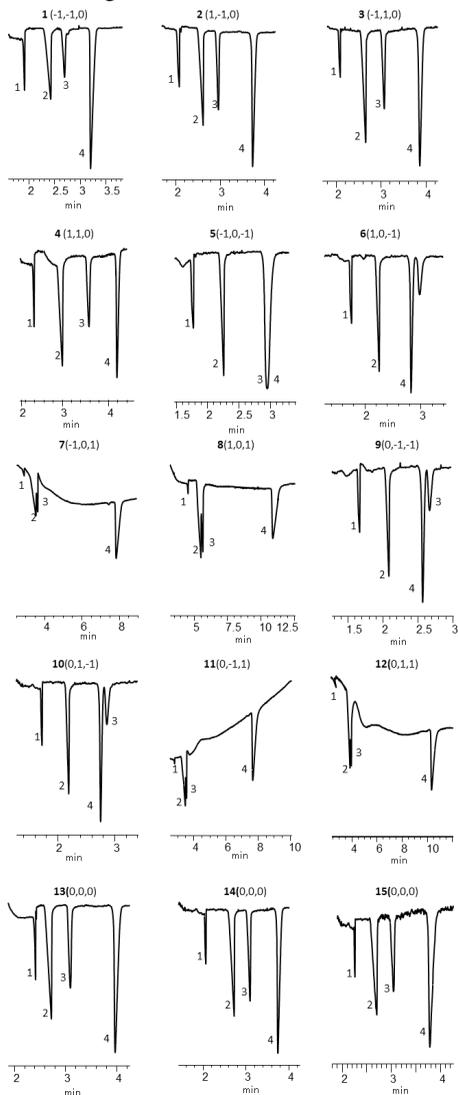
WANG, L.; XU, L. Cyclic Voltammetric Determination of Free and Total Sulfite in Muscle Foods Using an Acetylferrocene–Carbon Black–Poly (vinyl butyral) Modified Glassy Carbon Electrode. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 42, p. 10248–10253, 2014.

YOU DEN, W. J. **Statistical manual of the association of official analytical chemists**. [s.l.] Aoac International, 1975.



## APÊNDICE A – Eletroferogramas dos ensaios feito com solução de padrões e capilar do fabricante A

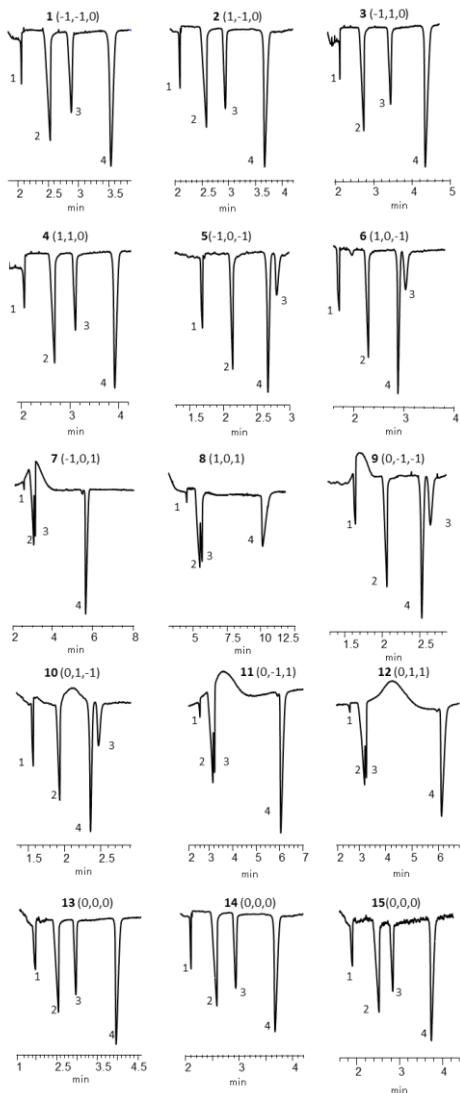
**Figura 16.** Eletroferogramas dos 15 ensaios realizados em solução padrão e capilar do fabricante A. Legenda: 1-sulfito; 2-malonato; 3-citrato e 4-fosfato.



Fonte: Próprio autor

## APÊNDICE B – Eletroferogramas dos ensaios feito com solução de padrões e capilar do fabricante B.

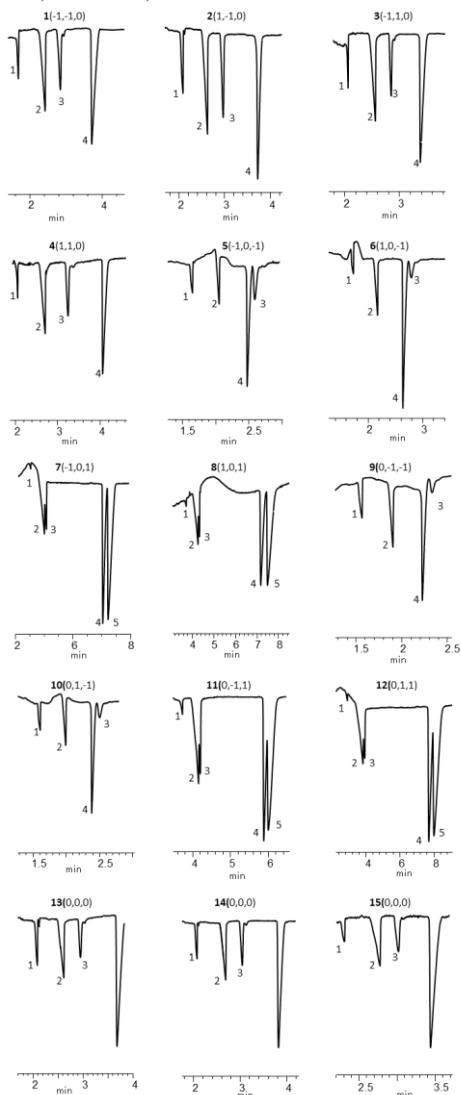
**Figura 17.** Eletroferogramas dos 15 ensaios realizados em solução padrão e capilar do fabricante B. Legenda: 1-sulfito; 2-malonato; 3-citrato e 4-fosfato.



Fonte: Próprio autor

## APÊNDICE C – Eletroferogramas dos ensaios feito com adição de solução de padrões em matriz de peixe e capilar do fabricante A.

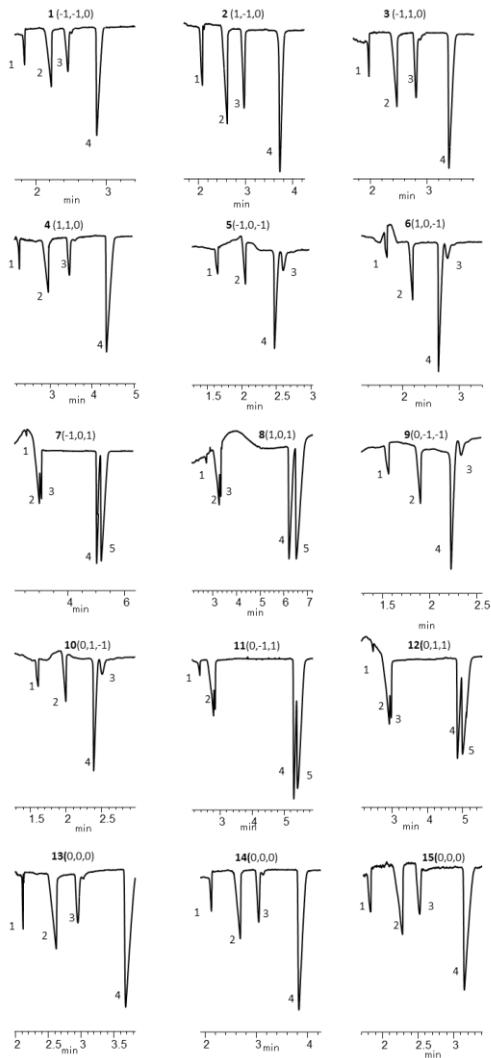
**Figura 18.** Eletroferogramas dos 15 ensaios realizados em solução padrão adicionada na matriz de peixe e capilar do fabricante A. Legenda: 1-sulfito; 2-malonato; 3-citrato; 4-fosfato; 5- lactato.



Fonte: Próprio autor

## APÊNDICE D – Eletroferogramas dos ensaios feito com adição de solução de padrões em matriz de peixe e capilar do fabricante B.

**Figura 19.** Eletroferogramas dos 15 ensaios realizados em solução padrão adicionada na matriz de peixe e capilar do fabricante B. Legenda: 1-sulfito; 2-malonato; 3-citrato; 4-fosfato; 5- lactato.



Fonte: Próprio autor

## ANEXO A – Métodos oficiais para determinação de sulfito e fosfato em pescado

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.**

**INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 25, DE 2 DE JUNHO DE 2011**

**MÉTODOS ANALÍTICOS OFICIAIS FÍSICO-QUÍMICOS PARA CONTROLE DE PESCADO E SEUS DERIVADOS**

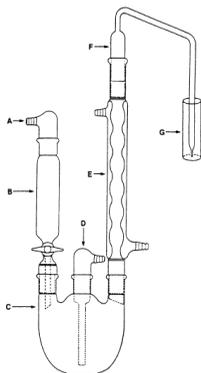
### **4.2. Anidrido sulfuroso e sulfitos**

4.2.1. Princípio O método mensura sulfitos livres e não livres, como os produtos provenientes de adições carbonílicas, em alimentos. Uma amostra é aquecida em presença de ácido clorídrico, convertendo os sulfitos em  $\text{SO}_2$ , levados por um fluxo de nitrogênio até uma solução de peróxido de hidrogênio na qual são oxidados a  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . O teor de sulfitos na amostra é então obtido a partir da titulação com uma solução padronizada de  $\text{NaOH}$ .

4.2.2. Campo de aplicação Aplicável a pescados com teor de sulfitos superior a 10 mg/kg, mesmo em presença de outros compostos sulfurosos voláteis.

4.2.3. Materiais e equipamentos

a) Aparelho de Monier-Williams conforme figura a seguir:



Aparelho de Monier-Willians:

- (A) tubo de vidro com junta para borbulhamento de gás;
  - (B) funil de adição com junta esmerilhada;
  - (C) balão de fundo redondo de 1000 mL com três bocas;
  - (D) tubo de vidro com junta para borbulhamento de gás;
  - (E) condensador de bolas;
  - (F) tubo de vidro em "U" com junta esmerilhada;
  - (G) recipiente receptor (pode ser utilizado um erlenmayer).
- b) Balança analítica com resolução mínima de 0,1 g;
  - c) Banho de circulação capaz de manter a água de resfriamento a uma temperatura inferior a 15°C;
  - d) Bureta de 10 mL;
  - e) Manta aquecedora;
  - f) Nitrogênio de alta pureza;
  - g) Processador de alimentos ou liquidificador.

#### 4.2.4. Reagentes e soluções

- a) Etanol 99%;
- b) Solução de ácido clorídrico 4 mol/L;
- c) Solução indicadora de vermelho de metila;
- d) Solução padronizada de hidróxido de sódio 0,01 mol/L;
- e) Solução de peróxido de hidrogênio a 3%.

#### 4.2.5. Procedimento de análise

- a) Montar o Aparelho de Monier-Willians, certificando-se de que as juntas não permitam vazamentos;
- b) Conectar o banho de circulação ao condensador (E) e inicie o fluxo do líquido refrigerante;
- c) Adicionar ao balão de três bocas (C) do aparelho 400 mL de água deionizada;
- d) Adicionar ao funil de separação (B) 90 mL de HCl 4 mol/L;
- e) Adicionar ao frasco receptor (G) 30 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% previamente titulados com uma solução 0,01 mol/L de NaOH até a coloração amarela utilizando o indicador vermelho de metila;
- f) Conectar o gás N<sub>2</sub> ao borbulhador (D) e iniciar o fluxo, mantendo-o em aproximadamente 200 mL/min;
- g) Aguardar cerca de 15 minutos para a desoxigenação do sistema;

- h) Transferir 50 g da amostra para o processador de alimentos, adicionando 5 mL de etanol e 95 mL de água. Triturar até que os pedaços possam passar pela junta 24/40 do balão de três bocas (C);
- i) Adicionar rapidamente esta mistura ao balão de três bocas (C) do aparelho;
- j) Através da conexão (A), aplicar N<sub>2</sub> sobre o HCl contido no funil de separação (B);
- k) Abrir a torneira do mesmo, adicionando-o ao sistema. Fechar a válvula quanto restarem cerca de 3 mililitros do ácido;
- l) Ligar o aquecimento a uma potência tal que entre 80 e 90 gotas/min do condensado retornem do condensador (E) ao balão (C);
- m) Deixar o conteúdo do balão (C) em ebulição por 1h40min;
- n) Recolher o receptor (G), titulando-o com solução de NaOH 0,01 mol/L até que o ponto final amarelo persista por mais de 20 segundos.

4.2.6. Expressão dos resultados  $SO_2 = 32,02 \cdot V \cdot 0,01 \cdot f \cdot 1000/m$  Em que:

32,02 = miliequivalente-grama do SO<sub>2</sub>;

V = volume de Solução de NaOH 0,01 mol/L gasto na titulação, em mL;

0,01 = concentração da Solução de NaOH, em mol/L;

f = fator de correção para a Solução de NaOH;

m = massa de amostra utilizada, em g. 4.2.7.

Referências bibliográficas AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 990.28. 18 ed. Gaithersburg: 2010.

## 4.5. Fósforo total

4.5.1. Princípio O método baseia-se na conversão fósforo presente na amostra em ortofosfato. A reação deste com molibdato em meio ácido produz um complexo misto molibdato/fosfato que, na presença do íon vanadato, forma o ácido molibdovanadofosfórico de cor amarelada. A intensidade da cor amarela é proporcional à concentração de íons fosfato na amostra e quantificada espectrofotometricamente a 420 nm.

4.5.2. Campo de aplicação Este método é aplicável a pescados e seus derivados.

4.5.3. Materiais e equipamentos

- a) Balança com resolução de 0,0001 g;

- b) Balões volumétricos de 100, 200 e 1000 mL;
- c) Béquer de 250 ou 300 mL;
- d) Cadinho de porcelana;
- e) Espectrofotômetro de absorção molecular;
- f) Forno mufla com programação de temperatura;
- g) Funil;
- h) Papel de filtro qualitativo;
- i) Pipetas graduadas ou pipetador automático;
- j) Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 e 10 mL;
- k) Placa aquecedora;
- l) Provetas;
- m) Vidro de relógio.

#### 4.5.4. Reagentes e soluções

- a) Solução ácido clorídrico 1+3;
- b) Ácido Nítrico;
- c) Fosfato de potássio monobásico;
- d) Solução de Metavanadato de amônio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ): Dissolver 1 g de metavanadato de amônio em 125 mL de água quente, deixar esfriar e adicionar 125 mL de ácido perclórico a 70%.
- e) Solução de Molibdato de amônio: Dissolver 20 g de molibdato de amônio tetrahidratado em 200 mL de água quente e deixar esfriar.
- f) Solução de molibdovanadato: Adicionar gradualmente a solução de molibdato à solução de metavanadato sob agitação e completar para 1000 mL.
- g) Solução padrão de fósforo: Solução estoque (2 mg de P/mL) - solubilizar em água deionizada exatamente 8,788 g de fosfato de potássio monobásico previamente seco em estufa a 105°C por duas horas, transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água deionizada e homogeneizar.
- h) Solução de trabalho (0,1 mg de P/mL) - Diluir 50 mL da solução estoque em 500 mL de água deionizada e 10 mL de ácido sulfúrico 20 mol/L, transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água deionizada e homogeneizar.

#### 4.5.5. Procedimento de análise

- a) Pesar 2,0 g da amostra em béquer de 150 mL. Levar à mufla e aumentar gradualmente a temperatura até 550 - 600°C, calcinando a amostra por 4h a esta temperatura;
- b) Adicionar 40 mL de ácido clorídrico 1+3 e algumas gotas de ácido nítrico, levar à ebulição em placa aquecedora, deixar esfriar;

- c) Filtrar para balão de 200 mL, completar o volume com água deionizada e homogeneizar;
- d) Pipetar uma alíquota desta solução para balão volumétrico de 100 mL de modo que a solução final tenha não mais que 1,5 mg de P/mL. Adicionar 20 mL da solução de molibdovanadato, completar o volume com água deionizada e aguardar 10 minutos;
- e) Preparar a curva de calibração a partir de alíquotas de 1, 2, 5, 7 e 10 mL da solução de trabalho de fósforo em balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 20 mL da solução de molibdovanadato, completar o volume e homogeneizar.
- f) Estas soluções possuem estabilidade limitada, devendo ser utilizadas imediatamente e descartadas logo após o uso.
- g) Fazer a leitura no espectrofotômetro em 420 nm utilizando branco contendo 20 mL da solução de molibdovanadato e 80 mL de água deionizada;
- h) Obter a concentração em mg de P na alíquota a partir da curva de calibração.

#### 4.5.6. Expressão dos resultados

$$P \text{ total em g/kg de P}_2\text{O}_5 = W \cdot V_{se} \cdot 2,29 / (m \cdot V_a)$$

Em que: W = mg de fósforo na alíquota, obtido da curva de calibração;

V<sub>se</sub> = volume da solução estoque, em mL;

V<sub>a</sub> = volume da alíquota, em mL; m = massa da amostra, em g,

2,29 = fator de conversão para P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

4.5.7. Referências bibliográficas AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 965.17. 18 ed. Gaithersburg: 2010.