



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Samantha Gonçalves

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS POR ELETROFORESE CAPILAR PARA
DETERMINAÇÃO DE SULFITO E POLIFOSFATOS EM PESCADO E PRODUTOS
CÁRNEOS**

Florianópolis

2023

Samantha Gonçalves

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS POR ELETROFORESE CAPILAR PARA
DETERMINAÇÃO DE SULFITO E POLIFOSFATOS EM PESCADO E PRODUTOS
CÁRNEOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador(a): Prof. Luciano Vitali, Dr.
Coorientador(a): Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.

Florianópolis

2023

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

Gonçalves, Samantha

Desenvolvimento de métodos por eletroforese capilar para determinação de sulfito e polifosfatos em pescado e produtos cárneos / Samantha Gonçalves ; orientador, Luciano Vitali, coorientador, Gustavo Amadeu Micke, 2023. 132 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Química. 2. Aditivos alimentares. 3. Eletroforese capilar. 4. Sulfito e polifosfato. 5. Desenvolvimento de métodos. I. Vitali, Luciano . II. Micke, Gustavo Amadeu. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Samantha Gonçalves

Desenvolvimento de métodos por eletroforese capilar para determinação de sulfito e polifosfatos em pescado e produtos cárneos

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 12 de maio de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Marcone Augusto Leal de Oliveira, Dr.
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Prof.^a Vivian Maria Burin, Dr.^a.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Eduardo Carasek da Rocha, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Química com especialização em Química Analítica.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Luciano Vitali, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus agradecimentos a todos aqueles que tiveram um papel fundamental na realização desta jornada acadêmica.

Aos meus orientadores, Professor Luciano Vitali e Professor Gustavo Amadeu Micke, expresso minha profunda gratidão pela dedicação e pelo compartilhamento de conhecimento.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-graduação em Química por proporcionarem uma oportunidade de aprendizado enriquecedor e por seu compromisso com um ensino público de excelência.

Aos meus pais, Maria e Sidney, agradeço por todo o carinho e incentivo.

Ao meu parceiro nesta jornada, Victor Rodrigues, expresso meu agradecimento por seu companheirismo, amizade sincera, carinho inestimável e compreensão constante, além de toda a ajuda valiosa fornecida ao longo dos anos.

Agradeço a Heitor Daguer por sua dedicação incansável e assistência inestimável na realização deste trabalho e ao longo da minha trajetória acadêmica.

Também expresso minha gratidão a Luciano Molognoni por sua ajuda e incentivo contínuos.

Aos colegas do Laboratório de Eletroforese Capilar (LabECC) e todos os seus agregados, tanto atuais quanto antigos, expresso meu apreço pela colaboração e amizade compartilhadas.

A Luiz Felipe e Patrícia Kayo, agradeço por enriquecerem minha vida com anos de amizade sincera e apoio mútuo.

Aos colegas do MAPA e SLAV-SC, agradeço a colaboração e compreensão.

Aos membros da banca examinadora, Professora Vivian Maria Burin e Professores Marcone Augusto Leal de Oliveira e Eduardo Carasek, agradeço por suas valiosas contribuições que enriqueceram este trabalho.

Por fim, expresso minha gratidão ao CNPq pela bolsa de estudos que tornou possível a realização deste trabalho.

RESUMO

A eletroforese capilar é uma técnica versátil que vem sendo muito utilizada para controle de alimentos devido à simplicidade dos seus métodos de execução e menor custo em relação a outras técnicas de separação. Com o objetivo de estender sua utilização ao controle de aditivos alimentares, foram desenvolvidos dois métodos de detecção indireta no UV-Vis. O primeiro método foi desenvolvido para a determinação de sulfito em pescado, utilizando a derivatização com formaldeído para formar o hidroximetilsulfonato e aumentar a estabilidade do sulfito. A concentração de formaldeído estabelecida foi de 0,3%, e foram propostos dois procedimentos de extração: extração sólido-líquido e extração líquido pressurizada com o sistema EDGE®. Não houve diferença entre os dois tipos de extração e ambos foram considerados adequados para a extração de sulfito. A avaliação do desempenho analítico dos dois processos de extração apresentou excelentes resultados, em conformidade com os parâmetros de validação. A seletividade foi comprovada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os limites de detecção menores que 3,50 mg kg⁻¹, limites de quantificação menores que 15,4 mg kg⁻¹ e recuperações entre 99% e 103% foram adequados. Foram analisadas 12 amostras, e em 8 dessas amostras, seus valores foram comparados com o método volumétrico de referência (Monier-Williams). Esse método foi publicado em 2022 no manual de métodos oficiais para análise de produtos de origem animal, como alternativa oficial do Ministério da Agricultura e Pecuária para determinação de sulfito em pescado. O segundo método foi desenvolvido para a determinação de ortofosfato, pirofosfato, tripolifosfato e trimetafosfato em pescados e produtos cárneos, empregando capilares de sílica revestidos com sal de quitosana quaternizada. As mobilidades dos analitos foram determinadas e utilizadas para otimização do eletrólito de corrida no software Peakmaster®, que foi composto de 30 mmol L⁻¹ de ácido fumárico e 60 mmol L⁻¹ de ácido amicocapróico, pH=4,08. A extração aquosa dos analitos foi realizada após inativação da fosfatase endógena por aquecimento em micro-ondas. Os limites de detecção variaram de 2,0 a 11,7 mg L⁻¹, e os limites de quantificação ficaram entre 6,7 e 41,5 mg L⁻¹. O método apresentou recuperações satisfatórias entre 93,5% e 101,1%. Foram analisadas 5 amostras de pescado e produtos cárneos, sendo que em duas amostras (presunto e salsicha), apresentaram teores de ortofosfato, expresso como P₂O₅, acima do estipulado pela legislação. Os dois métodos apresentados nesse trabalho demonstraram ser adequados para análises em laboratórios de alta frequência analítica e foram considerados adequados segundo os princípios da química verde e os valores medidos da eco-escala.

Palavras-chave: Aditivos alimentares; análise de alimentos; EDGE; métodos indiretos; polifosfatos; sal quaternizado de amônia; sulfito.

ABSTRACT

Capillary electrophoresis is a versatile technique that has been widely used for food control due to the simplicity of its execution methods and lower cost compared to other separation techniques. With the objective of extending its use to the control of food additives, two methods of indirect detection in UV-Vis were developed. The first method was developed for the determination of sulfite in seafood, using derivatization with formaldehyde to form hydroxymethylsulfonate and increase sulfite stability. The formaldehyde concentration was set to 0.3% and two extraction procedures were proposed: solid-liquid extraction and pressurized liquid extraction with the EDGE® system. There was no difference between the two types of extraction, and both were considered suitable for extraction. The evaluation of the analytical performance of the two extraction methods yielded excellent results, in accordance with the validation parameters. Selectivity was confirmed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Detection limits lower than 3.50 mg kg⁻¹, quantification limits lower than 15.4 mg kg⁻¹ and recoveries between 99% and 103% were adequate. Twelve samples were analyzed, and in 8 of these samples, their values were compared with the reference titrimetric method (Monier-Williams). The new method was published in 2022 as an official alternative by the Ministry of Agriculture and Livestock for determining sulfite in seafood. The second method was developed for the determination of orthophosphate, pyrophosphate, tripolyphosphate, and trimetaphosphate in seafood and meat products using silica capillaries coated with quaternized chitosan salt. The mobilities of the analytes were determined and used for optimization of the background electrolyte in the Peakmaster® software. The electrolyte (pH=4.08) was composed of 30 mmol L⁻¹ of fumaric acid and 60 mmol L⁻¹ of amicaproic acid. Aqueous extraction of analytes was performed after inactivation of endogenous phosphatase by microwave heating. The limits of detection ranged from 2.0 to 11.7 mg L⁻¹, and the limits of quantification were between 6.7 and 41.5 mg L⁻¹. The polyphosphates method yielded satisfactory recoveries between 93.5% and 101.1%. Five samples of seafood and meat products were analyzed. Two samples (ham and sausage) presented orthophosphate levels (expressed as P₂O₅) above the regulatory limit. The two methods developed in this work proved to be suitable for high throughput laboratories. Both methods were also suitable to the principles of green chemistry and the measured values of the eco-scale.

Keywords: EDGE; Food additives; food analysis; indirect methods; polyphosphates; quaternized ammonium salt; sulfite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar.....	21
Figura 2. Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal.....	23
Figura 3. (A) Estrutura do sal de quitosana quaternizada. (B) Perfil das curvas de mobilidade do fluxo eletrosmótico em função do pH, para capilares de sílica não revestidos e capilares revestidos com o sal de quitosana quaternizada (SAQQ).....	25
Figura 4. Os 12 princípios da química verde.....	26
Figura 5. Representação esquemática de sistema destilação para o método Monier-Williams.....	40
Figura 6. Representação esquemática do preparo de amostra utilizando a extração sólido-líquido (A) e extração líquido pressurizada automatizada (B).....	46
Figura 7. Eletroferogramas com sulfito (1) hidroximetilsulfonato – HMS (2), ácido malônico – padrão interno (3) e sinal desconhecido (*). (A) simulação no software Peakmaster; (B) solução padrão de sulfito 150 mg kg ⁻¹ derivatizada com formaldeído 0,003%; (C) solução padrão de sulfito 150 mg kg ⁻¹ derivatizada com formaldeído 0,3%; (D) curva de calibração em matriz em 100 mg kg ⁻¹ ; (E) amostra de camarão analisada.	51
Figura 8. Gráficos da porcentagem de formaldeído versus razões de área de pico normalizada (HMS/PI) em dois níveis de concentração (30 e 150 mg kg ⁻¹). (A) ensaio realizados em solvente (70% ACN); (B) ensaio realizado em amostra branca de camarão.	53
Figura 9. Eletroferogramas com hidroximetilsulfonato (1) e padrão interno do íon malonato (2). (A) solução padrão de sulfito (30 mg kg ⁻¹) derivatizada com formaldeído 0,3%; (B) solução padrão de sulfito (30 mg kg ⁻¹) derivatizado com formaldeído 1,0%.	54
Figura 10. Amostras brancas de camarão após extração pelo EDGE [®] . (A) amostra branca sem dispersante; (B) amostra branca com terra diatomácea; (C) amostra branca com celulose e (D) amostra branca com cortiça.	56
Figura 11. (I) Eletroferogramas sem sulfito e sem padrão interno; (II): Eletroferogramas sem sulfito e com padrão interno 50 mg kg ⁻¹ . (A) Extrato de amostra branca dispersa com terra diatomácea; (B) Extrato de amostra branca dispersa com celulose e (C) Extrato de amostra branca dispersa com cortiça. (*) Sinal do padrão interno (malonato).	57
Figura 12. Gráfico de Pareto obtido das interações principais entre as variáveis porcentagem de acetonitrila, massa de dispersante, tempo, temperatura e checagem da curvatura para o planejamento fracionado 2 ⁴⁻¹ . Os efeitos que ultrapassam a linha de p=0,05 são estatisticamente significativos sobre a resposta analítica com 95% de confiança. R ² = 0,846.	59

Figura 13. Superfícies de resposta do planejamento Box-Behnken para otimização da porcentagem de acetonitrila, tempo e temperatura. As respostas foram obtidas através das razões de área de sulfito e padrão interno malonato.....	61
Figura 14. Avaliação da seletividade. Parte I: (A) amostra em branco de camarão; (B) amostra branca de camarão fortificada com padrão interno (malonato) 50 mg kg ⁻¹ e (C) amostra branca de camarão fortificada com padrão interno (malonato) a 50 mg kg ⁻¹ e HMS a 100 mg kg ⁻¹ . (1) cloreto, (2) sulfato, (3) espécies desconhecidas, (4) sulfito derivatizado, (5) padrão interno (malonato) e (6 e 7) espécies desconhecidas. Parte II: resultados da análise LC-MS/MS) de amostra contendo HMS (íon precursor: m/z -110,9; fragmento: m/z -80,8).....	63
Figura 15. Amostras brancas de camarão (A -J), sem a presença do HMS na região 1, fortificadas com padrão interno malonato (2) em 40 mg kg ⁻¹	64
Figura 16. Gráficos da estabilidade dos extratos contendo 100 mg kg ⁻¹ de sulfito para: (A) extração sólido líquido e (B) extração PLE automatizada	69
Figura 17. Etapas do método de Williams e Vigh para determinação da mobilidade dos polifosfatos.	86
Figura 18. Representação esquemática do preparo de amostra para o método de determinação de fosfatos por CZE.....	92
Figura 19. Gráfico de mobilidade efetiva versus pH para os valores das mobilidades médias dos polifosfatos	96
Figura 20. Eletroferogramas para a separação dos analitos. (A) simulação utilizando o <i>software</i> Peakmaster [®] e (B) eletroferograma experimental em solução padrão. 1- trimetafosfato; 2- tripolifosfato; 3- pirofosfato; 4- P.I malonato e 5- ortofosfato.....	98
Figura 21. Superfície de resposta gerada através da otimização simultânea da temperatura e da voltagem utilizada na separação por eletroforese capilar	99
Figura 22. Eletroferogramas para a separação dos analitos e interferentes. (A) simulação utilizando o <i>software</i> Peakmaster [®] , (B) eletroferograma experimental com solução padrão dos analitos e (C) eletroferograma experimental de uma amostra de camarão fortificada com solução padrão dos analitos. 1- Cloreto; 2- sulfato; 3- trimetafosfato; 4- tripolifosfato; 5- sulfito; 6- pirofosfato; 7- P.I malonato; 8- ortofosfato; 9- citrato e 10- lactato.....	100
Figura 23. Gráfico de Pareto com o resultado do planejamento Doehlert para avaliar tempo de agitação e tempo de ultrassom.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. – Parâmetros e penalizações para determinação da Eco-escala.....	29
Tabela 2. Agentes sulfitantes permitidos para uso em camarões e outros crustáceos de acordo com a ANVISA	33
Tabela 3. Tabela com níveis e fatores para planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} para otimização da extração de HMS por PLE automatizado	43
Tabela 4. Tabela com níveis e fatores para planejamento Box-Behnken para otimização da extração de HMS por PLE automatizado	44
Tabela 5. Valores de F para verificação da a significância das regressões lineares através do teste F das curvas de calibração preparadas em matriz branca para sulfito com extração sólido-líquido e PLE automatizada.....	65
Tabela 6. Valores de precisão e recuperação, avaliado em três níveis de concentração, em três dias diferentes e com dois analistas diferentes	66
Tabela 7. Concentração de sulfito como SO_2 em amostras de camarão pelo método de CZE-DAD com extrações sólido-líquido e PLE automatizado e pelo método Monier Williams.....	70
Tabela 8. Eco-escala para o método de determinação de sulfito por CZE com extração sólido-líquido.....	72
Tabela 9. Eco-escala para o método de determinação de sulfito por CZE com PLE automatizado	72
Tabela 10. Eco-escala para o método de determinação de sulfito pelo método de Monier-Williams	73
Tabela 11. Principais fosfatos permitidos como aditivo em carnes, produtos cárneos e pescado de acordo com a ANVISA.....	76
Tabela 12. Métodos encontrados na literatura para determinação de fosfatos com as formas de inativação da fosfatase.....	80
Tabela 13. Composição e pH dos eletrólitos usados no método de Williams e Vigh para determinação das mobilidades dos analitos.....	89
Tabela 14. Matriz de experimento com fatores e níveis para otimização dos parâmetros de separação do método de polifosfatos por eletroforese capilar.....	90
Tabela 15. Matriz de experimento com fatores e níveis para otimização do tempo de agitação e tempo de ultrassom para extração de polifosfatos por eletroforese capilar.....	91
Tabela 16. Medidas de mobilidades iônicas calculadas pelo método de Williams e Vigh e valores de referência do Peakmaster	95

Tabela 17. Razões entre as inclinações das curvas externas com as curvas preparadas em matriz de camarão e carne	104
Tabela 18. Valores de F para verificação da significância das regressões lineares para as curvas de calibração para ortofosfato, pirofosfato, trimetafosfato e tripolifosfato	104
Tabela 19. Valores de precisão e recuperação para ortofosfato, pirofosfato, trimetafosfato e tripolifosfato	105
Tabela 20. 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	106
Tabela 21. Concentração de fosfatos em amostras de produtos cárneos e pescado.	107
Tabela 22. Eco-escala para o método de determinação de fosfatos por CZE	108
Tabela 23. Eco-escala para o método de determinação de fosfatos por HPLC com derivatização pós coluna	109
Tabela 24. Eco-escala para o método espectrométrico para determinação de fosfato total ...	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

AGREE - do inglês, *Analytical Greenness Calculator*

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC International - *Association of official analytical collaboration international*

CE - Eletroforese Capilar, do inglês, *Capillary Electrophoresis*

CEP - Potencial de Entrada na Célula de Saída

CITP - Isotacoforese Capilar, do inglês, *Capillary isotachopheresis*

CV - Coeficiente de Variação

CZE - Eletroforese Capilar de Zona, do inglês, *Capillary Zone Electrophoresis*

DAD – Detector de Arranjo de Diodos do inglês, *Diodo Array Detectors*

EDGE - *Energized Dispersive Guided Extraction*

EMD - Dispersão por Eletromigração, do inglês *Electromigration Dispersion*

FDA - *Food and Drugs Administration*

GAPI - Índice de Procedimento Analítico Verde, do inglês, *Green Analytical Procedure Index*

GC - Cromatografia a gás, do inglês, *Gas chromatography*

HILIC - Cromatografia por Interações Hidrofílicas, do inglês *Hydrophilic-Interaction Chromatography*

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IC - Cromatografia Iônica do inglês, *Ion Chromatography*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

MAPA - Ministério da Agricultura e Pecuária

MS - Espectrometria de massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MSPD - Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês, *Matrix Solid Phase Dispersion*

NEMI - Índice Nacional de Métodos Ambientais, do inglês, *National Enviromental Methods Index*)

PI – Padrão interno

PLE - Extração por Líquido Pressurizado, do inglês, *Pressurized Liquid Extraction*

³¹P NMR - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de fósforo³¹, do inglês, *31-Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy*

SPE - Extração Em Fase Sólida do inglês, *Solid Phase Extraction*

TCA - Ácido tricloroacético

TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano

UHPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, do inglês, *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1. USO DE ADITIVOS EM CARNE, PESCADO E DERIVADOS.....	18
1.2. ELETROFORESE CAPILAR.....	19
1.2.1. Instrumentação	20
1.2.2. Modos de detecção e detecção indireta	21
1.2.3. Fluxo eletrosmótico.....	22
1.2.4. Modificação de capilares.....	23
1.3. QUÍMICA VERDE EM ANÁLISE DE ALIMENTO	25
1.4. OBJETIVOS.....	31
1.4.1. Objetivo Geral	31
1.4.2. Objetivos específicos.....	31
CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA PARA DETERMINAÇÃO DE SULFITO EM AMOSTRAS DE PESCADO	32
2.1. INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO	32
2.1.1. Sulfito e agentes sulfitantes	32
2.1.2. Métodos para determinação de sulfito.....	34
2.1.3. Extração líquido pressurizada automatizada	36
2.2. EXPERIMENTAL.....	38
2.2.1. Reagentes e soluções	38
2.2.2. Programas utilizados e tratamento de dados	38
2.2.3. Instrumentação e método analítico	38
2.2.3.1. <i>Método comparativo por LC-MS/MS</i>	<i>39</i>
2.2.3.2. <i>Método comparativo Monier Williams</i>	<i>40</i>
2.2.4. Desenvolvimento do método	41
2.2.4.1. <i>Medidas de mobilidade.....</i>	<i>41</i>
2.2.4.2. <i>Otimização e formação do HMS.....</i>	<i>41</i>
2.2.4.3. <i>Otimização dos materiais dispersantes e filtros para extração por PLE automatizado</i>	<i>42</i>
2.2.4.3.1. <i>Otimização multivariada dos parâmetros da extração por PLE automatizado.....</i>	<i>42</i>

2.2.5.	Amostras	44
2.2.5.1.	<i>Preparo da amostra por extração sólido-líquido</i>	44
2.2.5.2.	<i>Preparo da amostra por extração PLE automatizada</i>	45
2.2.6.	Validação analítica	47
2.2.6.1.	<i>Seletividade</i>	47
2.2.6.2.	<i>Linearidade e efeito de matriz</i>	47
2.2.6.3.	<i>Precisão e Exatidão</i>	48
2.2.6.4.	<i>Incerteza de medição</i>	48
2.2.6.5.	<i>Limites de detecção, quantificação e estabilidade</i>	49
2.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
2.3.1.	Otimização do método de separação	50
2.3.2.	Formação do HMS	52
2.3.3.	Preparo das amostras	54
2.3.3.1.	<i>Preparo por extração sólido-líquido</i>	54
2.3.3.2.	<i>Preparo das amostras por PLE automatizado</i>	56
2.3.3.2.1.	<i>Otimização do material dispersante e filtros</i>	56
2.3.3.2.2.	<i>Planejamento experimental multivariado para otimização dos demais parâmetros do EDGE</i>	58
2.3.4.	Validação	62
2.3.4.1.	<i>Seletividade</i>	62
2.3.4.2.	<i>Efeito de matriz e linearidade</i>	64
2.3.4.3.	<i>Precisão e exatidão</i>	65
2.3.4.4.	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	67
2.3.4.5.	<i>Incerteza</i>	67
2.3.4.6.	<i>Estabilidade</i>	68
2.4.	APLICAÇÃO DO MÉTODO	70
2.6.	CONCLUSÕES	74
CAPÍTULO 3 - DETERMINAÇÃO DE POLIFOSFATOS EM PESCADO E PRODUTOS CÁRNEOS POR ELETROFORESE CAPILAR EMPREGANDO CAPILAR MODIFICADO COM SAL DE QUITOSANA QUATERNIZADA.....		
75		
3.1.	INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO	75
3.1.1.	Fosfatos	75
3.1.2.	Métodos para a determinação de fosfatos	76
3.2.	EXPERIMENTAL	84

3.2.1.	Reagentes e soluções	84
3.2.2.	Programas utilizados e tratamento de dados	84
3.2.3.	Instrumentação e método analítico	84
3.2.4.	Medida da estabilidade do capilar revestido com SAQQ	85
3.2.5.	Desenvolvimento do método	86
3.2.5.1.	<i>Determinação das mobilidades pelo método de Williams e Vigh</i>	86
3.2.5.2.	<i>Otimização do eletrólito de corrida.....</i>	89
3.2.5.3.	<i>Otimização multivariada da voltagem e temperatura</i>	90
3.2.5.4.	<i>Otimização do preparo da amostra</i>	90
3.2.6.	Amostras.....	91
3.2.6.1.	<i>Preparo das amostras</i>	91
3.2.7.	Validação analítica	92
3.2.7.1.	<i>Seletividade.....</i>	93
3.2.7.2.	<i>Linearidade e efeito de matriz</i>	93
3.2.7.3.	<i>Precisão e exatidão.....</i>	94
3.2.7.4.	<i>Limites de detecção, quantificação.....</i>	94
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
3.3.1.	Desenvolvimento do método	95
3.3.2.	Estabilidade do capilar revestido com SAQQ.....	101
3.3.3.	Preparo das amostras	101
3.3.4.	Validação	103
3.3.4.1.	<i>Seletividade.....</i>	103
3.3.4.2.	<i>Efeito de matriz e linearidade.....</i>	104
3.3.4.3.	<i>Precisão e exatidão.....</i>	105
3.3.4.4.	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	106
3.4.	APLICABILIDADE DO MÉTODO	107
3.5.	ECO-ESCALA	108
3.6.	CONCLUSÕES	110
	CONCLUSÃO FINAL	111
	REFERÊNCIAS	112
	APÊNDICE A – RAZÕES DE ÁREA OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES COM OS FILTROS C1, C3, C4, C7, M2+C9 E C9+G1+C9.....	124
	APÊNDICE B – NÍVEIS, VARIÁVEIS E A RESPOSTA OBTIDA PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 3² PARA DETERMINAÇÃO DAS	

CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E VOLTAGEM PARA SEPARAÇÃO DE POLIFOSFATOS.	125
---	------------

INTRODUÇÃO

Aditivos alimentares são utilizados em peixes, carnes e produtos derivados para diversas finalidades e auxiliam na preservação da qualidade desses produtos aumentando o tempo de armazenamento. Apesar de os aditivos alimentares propiciarem satisfação sensorial aos consumidores, vantagens comerciais e de conservação, é conhecido que alguns deles apresentam potenciais riscos à saúde humana e podem gerar fraudes econômicas. Portanto, é necessário efetuar avaliações quantitativas do teor de alguns desses aditivos. As análises de alimentos fornecem informações essenciais sobre a qualidade dos produtos, auxiliam a avaliação de padrões de qualidade e a conformidade com a legislação.

Dentre os aditivos estudados, está o sulfito, que é utilizado em camarões e outros crustáceos para evitar o processo de escurecimento enzimático conhecido como melanose. A presença desse aditivo pode ocasionar reações alérgicas graves e ataques asmáticos em indivíduos sensíveis ao sulfito. Outra classe de aditivos estudados são os fosfatos, que são empregados em pescado, carnes e produtos derivados, tendo como principal função aumentar a capacidade de retenção de água dos alimentos. Esses compostos também podem ser usados como emulsificantes e inibidores de rancidez. Dentre as espécies de fosfatos usadas como aditivo, estão o ortofosfato, o pirofosfato, o tripolifosfato e o trimetafosfato. Apesar de suas vantagens, o uso excessivo desses aditivos é caracterizado como fraude econômica.

O método clássico utilizado para o monitoramento dos fosfatos consiste em um método de conversão de todo o fósforo da amostra em ortofosfato, que é detectado espectrofotometricamente na forma de um complexo com molibdato. Para a análise de espécies diferentes de fosfato, é empregado um método qualitativo por cromatografia líquida com derivatização pós-coluna. Já o controle do sulfito é realizado pelo método conhecido como Monier Williams, no qual o sulfito é convertido em SO_2 por destilação com ácido clorídrico, levado por um fluxo de nitrogênio até uma solução de peróxido de hidrogênio, onde é oxidado a ácido sulfúrico e titulado com hidróxido de sódio.

Os métodos oficiais utilizados pelo Ministério da Agricultura são métodos clássicos, laboriosos e não estão atualizados com os princípios da química verde. Demandam longos tempos de análise, grande consumo de reagentes e geração de grandes volumes de resíduos. Esses problemas, juntamente com a grande demanda de análises para a fiscalização e o controle

de qualidade de pescados e cárneos, demonstram a necessidade de novos métodos menos laboriosos e com boa frequência analítica para a quantificação desses aditivos, para aplicação em laboratórios de análise de alimentos.

No cenário apresentado, a técnica de eletroforese capilar é vantajosa para o desenvolvimento de métodos que visam o monitoramento desses aditivos, pois possui tempos de análise curtos e menor custo em comparação com outras técnicas de separação, permitindo que análises de rotina sejam realizadas com boa frequência analítica e de forma eficiente.

Este trabalho está dividido em três capítulos. No capítulo 1, é apresentada a revisão da literatura. No capítulo 2, é apresentado um novo método por eletroforese capilar para determinação de sulfito com derivatização com formaldeído, e dois procedimentos de extração foram otimizados, extração sólido-líquido e extração líquido-pressurizada automatizada. No capítulo 3, foi desenvolvido um método para determinação de ortofosfato, pirofosfato, trimetafosfato e tripolifosfato por eletroforese capilar, utilizando capilares de sílica revestidos com sal de quitosana quaternizada.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA

1.1. USO DE ADITIVOS EM CARNE, PESCADO E DERIVADOS

Carne, pescado e seus derivados são fontes de proteína animal ricas em diversos constituintes benéficos a saúde humana como ácidos graxos insaturados e grandes quantidades de vitaminas e minerais. Entretanto, esses alimentos possuem composições que os tornam altamente suscetíveis à deterioração (SILVERS; SCOTT, 2002). Dentre as diversas fontes de proteína animal, os produtos advindos de fontes aquáticas carregam uma grande variedade de microrganismos provenientes de fontes terrestres e aquáticas, proteínas musculares lábeis e possuem também uma grande concentração de água livre, nutrientes e enzimas proteolíticas. Devido a esses fatores o pescado é a proteína animal mais suscetível a deterioração (SUN, 2016).

O emprego de boas práticas de fabricação, manutenção de condições de higiene, controle das condições sanitárias para manter baixos níveis iniciais da microbiota e conter os mecanismos de degradação, ajudam a garantir a qualidade do produto (SOUZU; SATO; KOJIMA, 1989; SUN, 2016). Outro recurso que é utilizado para a entrega de um produto final de boa qualidade é o emprego de aditivos alimentares, que são definidos 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 (BRASIL, 2023a).

A instrução normativa (IN) nº 211 de março 2023 dispõe os aditivos alimentares que são permitidos no Brasil em pescado, cárneos e produtos derivados. A lista de aditivos permitidos é extensa e incluem compostos com as funções de corantes, estabilizantes, espessantes, antioxidantes, aromatizantes, reguladores de sabor e acidez, antieméticos e emulsores, emulsificantes e realçadores de sabor (BRASIL, 2023b). Compete à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a regulamentação do uso de aditivos em alimentos no Brasil, e somente podem ser utilizados esses compostos que estejam previstos na legislação específica para a categoria de alimento correspondente. Embora os aditivos alimentares possam proporcionar grande satisfação sensorial, conveniência comercial e vantagens na conservação dos alimentos é conhecido que alguns aditivos apresentam possíveis riscos à saúde humana, e

podem gerar fraude econômica. Sendo assim, é crucial realizar análises quantitativas do teor de aditivos alimentares (WU et al., 2022).

O interesse e a preocupação dos consumidores em relação à qualidade dos alimentos, seu valor nutricional, presença de aditivos e resíduos perigosos têm aumentado nos últimos anos, tornando-se assuntos de interesse público. Isso tem levado, em muitos casos, a mudanças nos requisitos de rotulagem, monitoramento e controle de adulterações e fraudes econômicas em alimentos (SIMÓ; BARBAS; CIFUENTES, 2005; WU et al., 2022).

Desenvolver novos procedimentos analíticos para alimentos é crucial para detectar as mais sofisticadas adulterações, atendendo às exigências cada vez mais rigorosas dos consumidores, agências reguladoras e laboratórios. Foram desenvolvidos diversos métodos para substituir as técnicas clássicas utilizadas na análise de aditivos, incluindo métodos com técnicas espectrofotométricas, gravimétricas, cromatográficas e eletroforéticas.

1.2. ELETROFORESE CAPILAR

Nos últimos dez anos a eletroforese capilar tem emergido como uma técnica promissora para análise de uma ampla variedade de substâncias, graças às suas altas capacidades de separação, colunas e consumíveis acessíveis e tempos de análise rápidos (BOYCE, 2001; FRAZIER; AMES; NURSTEN, 1999).

A eletroforese é uma técnica de separação que consiste na diferença de migração de compostos iônicos ou ionizáveis sob a influência de um campo elétrico. Essa técnica foi pioneiramente apresentada por Arne Tiselius na década de 1930 para separação parcial de proteínas do soro sanguíneo, sendo esse trabalho reconhecido com o prêmio Nobel em 1948 (TAVARES, 1996). A técnica de eletroforese foi então aprimorada com o intuito de alcançar uma maior eficiência e reduzir os efeitos térmicos causados pela aplicação do campo elétrico. Foram então incorporadas colunas capilares para a separação no sistema de eletroforese denominando assim a técnica como Eletroforese Capilar (CE, do *inglês Capillary Electrophoresis*) (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). Somente em 1981 Jorgenson e Lukacs, reportaram o uso de capilares de sílica fundida com diâmetros internos de 75 μm e descreveram os parâmetros operacionais e de qualidade da separação (JORGENSEN; LUKACS, 1981). Ao longo das últimas décadas, a eletroforese capilar se consolidou como uma

técnica de separação, sustentada por uma extensa literatura que aborda aspectos teóricos e inúmeras aplicações.

A eletroforese capilar tem um impacto significativo, não só devido à sua simplicidade instrumental e desempenho, mas especialmente por causa da grande diversidade de modos de separação que podem ser realizados como a cromatografia eletrocínética micelar (MEKC, do inglês *Micellar Electrokinetic Chromatography*) que é utilizada principalmente para a separação de compostos neutros com o auxílio de micelas para a separação; eletroforese capilar em gel (CGE, do inglês *Capillary Gel Electrophoresis*) onde a separação é baseada no tamanho relativo dos analitos em um capilar preenchido com uma matriz polimérica e costuma ser aplicada para análises de proteínas e ácidos nucleicos; cromatografia eletrocínética (EKC, do inglês *Electrokinetic Chromatography*) que combina as vantagens da cromatografia líquida e CE utilizando capilares recheados com uma fase estacionária, dentre outras. O modo de operação mais utilizado é a eletroforese capilar em solução livre (FSCE, do inglês *Free Solution Capillary Electrophoresis*) chamada também de 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, 2008).

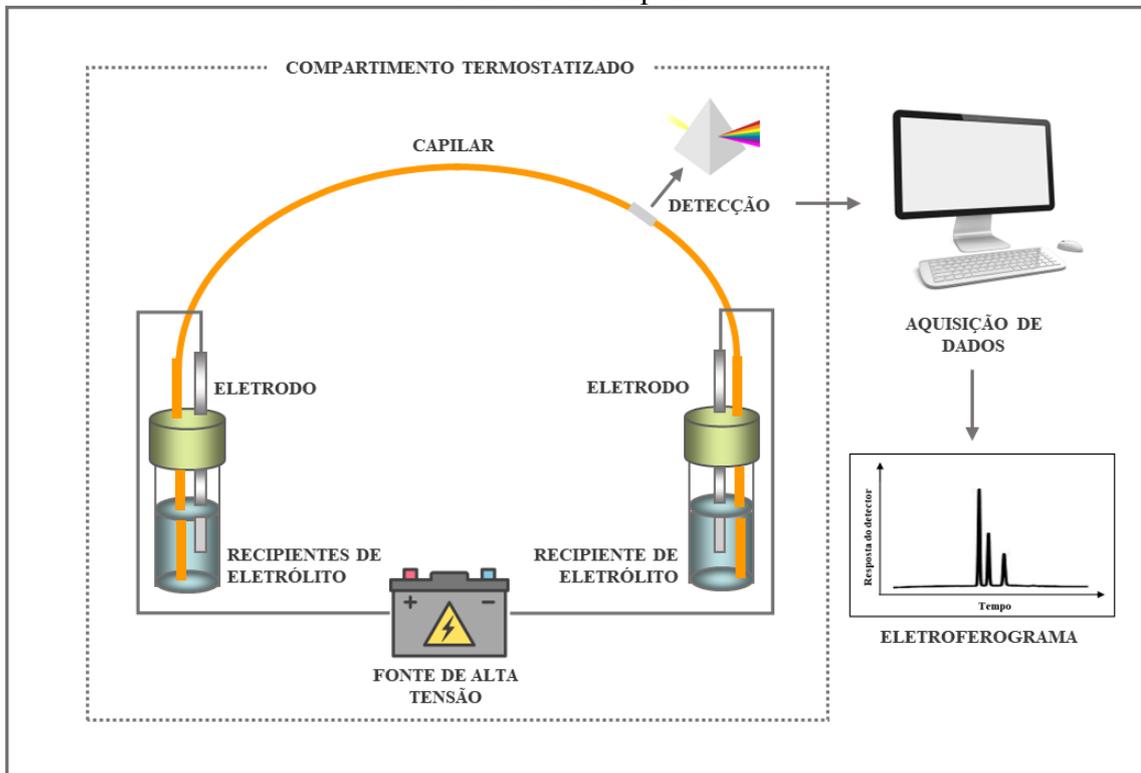
1.2.1. Instrumentação

Comparados a outros equipamentos de outras técnicas de separação, os instrumentos comerciais utilizados em CE são relativamente simples, como mostrado no diagrama da figura 1. Os componentes básicos do instrumento incluem uma fonte de alta tensão (operada com voltagens de 0 a 50 kV), capilares (normalmente de sílica fundida, com diâmetro interno de 15 a 200 μm e comprimento entre 30 e 150 cm), dois eletrodos de material inerte (comumente de platina), um detector apropriado e um computador para o tratamento dos dados (TAVARES, 1996).

O processo de introdução da amostra em um capilar pode ser realizado por meio de um método eletrocínético, que consiste na aplicação de um potencial no reservatório da amostra

por um determinado tempo. Esse modo de injeção é dependente da mobilidade de cada analito presente na amostra, podendo, assim, ocorrer a injeção de quantidades diferentes de cada analito, o que, em alguns casos, pode ser uma desvantagem. O modo de introdução de amostra mais utilizado em CE é a injeção hidrodinâmica, na qual uma porção representativa da composição do soluto presente na amostra é inserida no capilar através da aplicação de pressão no reservatório da amostra por um curto período de tempo, transferindo um volume determinado para o interior do capilar (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

Figura 1. Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar



Fonte: Adaptado de (PIOVEZAN, 2012)

1.2.2. Modos de detecção e detecção indireta

Muitos tipos de detectores podem ser utilizados em CE, como espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*), detectores eletroquímicos e fluorescência, porém os detectores usuais mais empregados são baseados em medição da absorbância UV-Vis, como o DAD (do inglês, *Diode Array Detector*). A escolha deste detector está relacionada com a

medida direta da absorção, o que deixa limitado aos compostos que possuem uma absorvidade molar relativamente alta. Compostos com baixa absorvidade molar, como alguns íons inorgânicos, não são detectados diretamente. Contudo, em CE é possível utilizar o modo de detecção indireto, utilizando um componente cromóforo no BGE (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

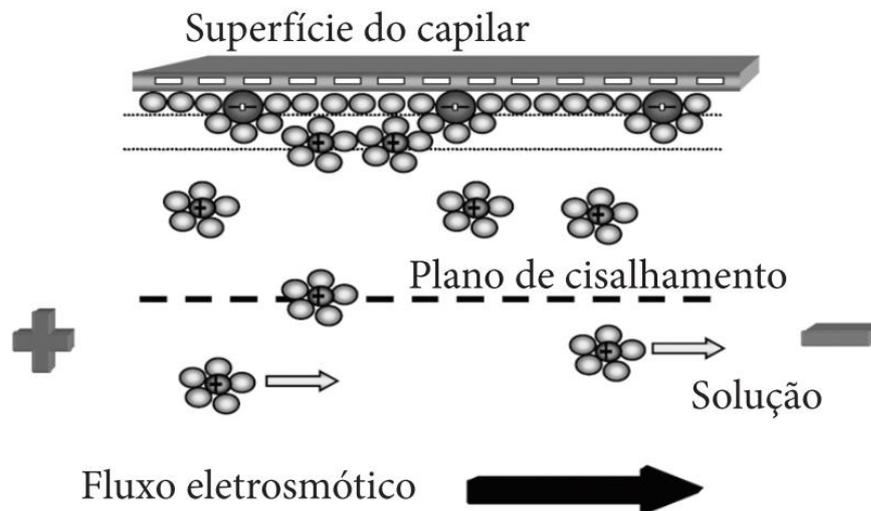
O modo de detecção indireta é uma grande vantagem da CE em relação a outras técnicas de separação, pois possibilita a detecção de compostos que não possuem grupos cromóforos ou que possuem baixa absorvidade molar, sem o uso de derivatização (DOBLE; HADDAD, 1999; ŽUNIĆ et al., 2002). Este modo de detecção é fundamentado na capacidade do componente do eletrólito, que absorve radiação na região do UV-Vis, tem de deslocar o analito, que não absorve. Como resultado é observado no eletroferograma o decréscimo do sinal, gerando um pico negativo, que pode ser detectado e quantificado. No entanto, é possível transformar os picos negativos em um sinal positivo por meio da seleção de um comprimento de onda de referência que possa inverter o sinal. A instrumentação necessária é equivalente à utilizada na detecção direta, que é facilmente encontrada comercialmente e é simples de ser utilizada (DOBLE; HADDAD, 1999).

1.2.3. Fluxo eletrosmótico

Um fenômeno inerente à técnica de eletroforese e importante para o entendimento da separação química 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, que possuem um caráter ácido e em contato com uma solução de pH acima de 2 são ionizados (SiO⁻). A ionização dos silanóis aumenta a concentração de íons H⁺ presentes na solução que preenche o capilar e carregando sua parede interna negativamente. A certa distância da parede negativa do capilar, chamado plano de cisalhamento, não há mais atração entre o próton solvatado e os grupos SiO⁻. 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 (SEGATO; SILVA; JARDIM, 2009).

A magnitude do EOF depende 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 forte. Desta maneira, o pH do meio deve considerar tanto a ionização dos analitos quanto a força do EOF, para que condições adequadas sejam utilizadas (LANDERS, 2008; SEGATO; SILVA; JARDIM, 2009). Quando os analitos migram na mesma direção do EOF, a análise é denominada coeletrosmótica, enquanto quando a migração ocorre em direções opostas, a análise é do tipo contraeletrosmótica.

Figura 2. Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal.



Fonte: (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012)

1.2.4. Modificação de capilares

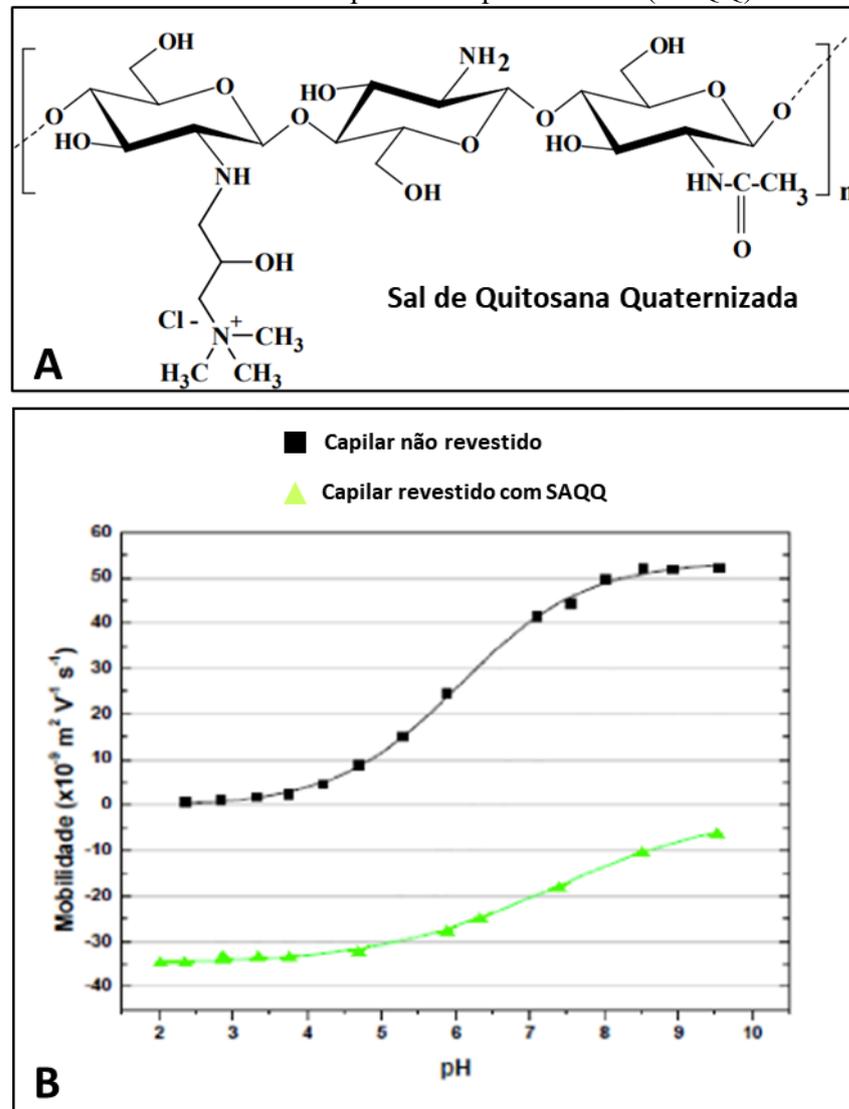
Devido a essa dependência da magnitude do EOF com o pH do eletrólito e a superfície do capilar, uma das maneiras de alterar o sentido do EOF e/ou a sua magnitude é a partir do uso de capilares modificados. Essas modificações podem ser feitas de três formas diferentes: A

partir do uso de pequenas moléculas como aditivos na solução de separação; a partir de revestimento polimérico covalentemente ligado a sílica; e revestimento usando polímero adsorvido fisicamente na sílica. A modificação por adsorção física dos polímeros nos capilares é um dos procedimentos que traz mais vantagens em relação aos outros modos, uma vez que não interfere nas propriedades de alguns analitos como os surfactantes, não necessita de longos tempos de equilíbrio para revestir a parede interna do capilar e compatível com o uso de detectores como MS e há possibilidade de regenerar o revestimento (VITALI, 2012).

A partir dos revestimentos dos capilares de sílica é possível obter diferentes perfis de EOF em função do pH e promover melhorias em alguns métodos de separação por CE. Uma das principais vantagens do uso de capilares revestidos é a diminuição de interações indesejáveis de substâncias presente nas matrizes com a parede do capilar que modificam o EOF e prejudicam a reprodutibilidade dos métodos. Para amostras complexas como cárneos é pescado os revestimentos previnem a adsorção de proteínas nas paredes do capilar de sílica minimizando a variação do EOF e aumentando a durabilidade dos capilares por reduzir a necessidade de processos de limpeza agressivos que causam desgastes (DA SILVA et al., 2020; VITALI et al., 2014).

Nas últimas décadas o sal de quitosana quaternizada (SAQQ), um derivado da quitosana (Figura 3A), vem sendo aplicado como modificador de capilar. Com o uso do SAQQ novos grupos funcionais são introduzidos na parede do capilar gerando uma inversão e um novo perfil do EOF, quando comparado ao capilar de sílica sem revestimento com SAQQ (Figura 3B). O uso do SAQQ foi descrito para modificação de capilares para diferentes matrizes e analitos, como análises de nitrato e nitrito em leite (DA SILVA et al., 2020), creatina em urina (VITALI et al., 2017), iodeto em formulações farmacêuticas (VITALI et al., 2011), resíduos de sulfonamidas em frango, carne e mel (MA et al., 2007) e outros. Esses trabalhos demonstram a diversidade de aplicação do revestimento com SAQQ em capilares de CE, que propicia vantagens como estabilidade do EOF, reprodutibilidade das análises e preparos de amostras mais simples que necessitam de menos etapas e limpeza.

Figura 3. (A) Estrutura do sal de quitosana quaternizada. (B) Perfil das curvas de mobilidade do fluxo eletrosmótico em função do pH, para capilares de sílica não revestidos e capilares revestidos com o sal de quitosana quaternizada (SAQQ).



Fonte: Adaptado de Vitali (VITALI, 2012)

1.3. QUÍMICA VERDE EM ANÁLISE DE ALIMENTO

O conceito de química verde foi introduzido por Anastas e Warner em 1998 e surgiu como uma resposta à necessidade de modificações nas condutas químicas, visando principalmente à prevenção das consequências negativas causadas por algumas atividades e/ou produtos (ANASTAS; WARNER, 1998).

A química verde, também chamada de química sustentável, pode ser definida como a criação, desenvolvimento e aplicação de produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Esse conceito, que também está relacionado à tecnologia limpa, vem crescendo em aplicações industriais principalmente em países com indústria química avançada e que possuem maior rigor no controle de poluentes. No meio acadêmico tanto em ensino quanto na pesquisa os preceitos da química verde estão sendo incorporados ao longo das últimas décadas (SHELDON, 2018).

Os 12 princípios da química verde proposto por Anastas e Warner estão na Figura 4.

Figura 4. Os 12 princípios da química verde



Fonte: (SILVA JÚNIOR; JESUS; GIROTTO JÚNIOR, 2022)

Visando aplicar os conceitos da química verde em outras áreas como a química analítica, Galuszka e colaboradores (GALUSZKA et al., 2012) adaptaram e reformularam os 12 preceitos da química verde para que dessa forma procedimentos analíticos como métodos, preparo de amostras e outras etapas fossem considerados:

1. Optar por técnicas analíticas que possibilitem análise direta, evitando assim a necessidade de preparo de amostras;
2. Reduzir a quantidade e o número de amostras necessárias para as análises;
3. Utilizar preferencialmente medidas *in situ*;
4. Integrar as etapas do procedimento analítico para economizar energia e reduzir o consumo de reagentes;
5. Métodos automatizados e miniaturizados devem ser preferíveis;
6. Evitar procedimentos de derivatização;
7. Evitar a geração de grandes volumes de resíduos e garantir o tratamento e destinação adequados desses materiais;
8. Preferir métodos que determinam vários analitos e/ou parâmetros simultaneamente;
9. Reduzir o consumo de energia elétrica;
10. Dar preferência ao uso de reagentes provenientes de fontes renováveis;
11. Eliminar ou substituir reagentes tóxicos utilizados no método;
12. Priorizar a segurança do analista.

Nos últimos anos, ocorreram muitos avanços no desenvolvimento de métodos e procedimentos analíticos ecologicamente mais conscientes. Com esses progressos surgiram diversas ferramentas métricas para avaliação quantitativa e qualitativa da conformidade desses métodos com os princípios da química verde. Dentre as principais ferramentas utilizadas podem ser citados o NEMI, do inglês, *National Environmental Methods Index* e o GAPI, do inglês, *Green Analytical Procedure Index*, que utilizam pictogramas em escalas de cores que vai de verde a vermelho para indicar o grau de aceitabilidade ecológica. A ferramenta AGREE do inglês, *Analytical Greenness Calculator*, utiliza um algoritmo para expressar

quantitativamente, de 0 a 1 a concordância do método com a química verde (NOWAK; WIETECH-POŚLUSZNY; PAWLISZYN, 2021).

A eco-escala é uma ferramenta métrica proposta por Gałuszka e colaboradores no qual são contabilizados todos os parâmetros do método que podem acarretar algum tipo de prejuízo ambiental como: a quantidade de energia consumida, quantidade de resíduo gerada, quantidade de reagentes gastos e suas toxicidades. São atribuídos pontos de penalidade aos parâmetros que se afastam do ideal, e esses valores são subtraídos de 100 pontos. A pontuação resultante classifica os procedimentos analíticos em excelente para química verde (>75 pontos), aceitável para química verde (<75 e >50 pontos) e inadequado para química verde (<50 pontos) (DELLA BETTA et al., 2016; GAŁUSZKA et al., 2012).

A avaliação de risco dos reagentes é feita pelo sistema harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos (GHS, do inglês, *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*). Para cada pictograma de risco correspondente ao composto químico, é atribuída uma penalização e se o composto for considerado perigoso é aplicado um fator multiplicador de 2, já os reagentes que apenas requerem atenção são multiplicados por 1. O volume de resíduo também é contabilizado e resíduos em excesso geram mais penalizações, que aumentam se não forem tratados adequadamente. E a energia gasta pelos equipamentos na análise também é penalizada (GAŁUSZKA et al., 2012). A Tabela 1 demonstra a construção da tabela da eco-escala e suas penalidades.

Tabela 1. – Parâmetros e penalizações para determinação da Eco-escala

REAGENTES			
		Subtotal (penalizações)	Total (penalizações)
Quantidade	< 10 mL (g)	1	Quantidade x risco
	10-100 mL (g)	2	
	> 100 mL (g)	3	
Risco (físico, ambiental, à saúde)	Nenhum	0	
	Baixo	1	
	Alto	2	
RESÍDUOS			
Quantidade	Nenhum		0
	< 1 mL (g)		1
	1-10 mL (g)		3
	> 10 mL (g)		5
Característica	Reciclagem ou reuso		0
	Degradação		1
	Passivação		2
INSTRUMENTOS			
Energia	≤ 0,1 kWh por amostra		0
	≤ 1,5 kWh por amostra		1
	> 1,5 kWh por amostra		2
Risco ocupacional	Hermetização do processo		0
	Emissão de gases ou vapores no ar		3
Somatório dos pontos			TOTAL

Fonte: Adaptado de (GAŁUSZKA et al., 2012)

As ferramentas métricas citadas são amplamente reportadas na literatura para avaliação de novos procedimentos analíticos destinados à análise de alimentos, como preparo de amostra para extração de polifenóis em vinho (PEREIRA-COELHO et al., 2023), método de separação de nitrato e nitrito em produtos cárneos (DELLA BETTA et al., 2016), sulfonamidas em leite e produtos cárneos (DUAN et al., 2021), determinação de colágeno em produtos cárneos e suplementos alimentares (ALVES et al., 2023), determinação de aminas biogênicas em cárneos (WOJNOWSKI; NAMIEŚNIK; PŁOTKA-WASYLKA, 2019).

O uso de métodos instrumentais modernos gera procedimentos analíticos com características adequadas à química verde, pois estes são geralmente automatizados, possuem maior eficiência energética e usam menores quantidades de amostra, quando comparados com métodos clássicos, como métodos volumétricos. A técnica de eletroforese capilar é uma das mais compatíveis com os princípios da química verde, já que usa principalmente água como solvente, quantidades de amostras reduzidas e produz poucos resíduos. Além disso, o número

de experimentos durante o desenvolvimento do método pode ser diminuído e algumas vezes até eliminado quando utilizados *softwares* de simulação como o Peakmaster[®] (DELLA BETTA et al., 2016).

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar dois métodos para determinação de sulfito e fosfatos em amostras de pescado e produtos cárneos empregando eletroforese capilar com detecção indireta.

1.4.2. Objetivos específicos

- Otimizar as condições de extração do sulfito com derivatização com formaldeído;
- Desenvolver um procedimento de extração sólido-líquido para sulfito em amostras de pescado;
- Desenvolver um procedimento de extração líquido pressurizada automatizada no sistema EDGE[®];
- Otimizar os parâmetros instrumentais para desenvolver um método de separação para determinação de sulfito derivatizado;
- Validar o método proposto seguindo protocolo de validação do INMETRO e AOAC;
- Aplicar o método em amostras de análise fiscal;
- Determinar as mobilidades dos fosfatos e otimizar as condições de separação pelo *software* Peakmaster[®];
- Otimizar a separação dos fosfatos em um capilar de sílica revestido com SAQQ e avaliar a estabilidade dos capilares revestidos;
- Otimizar a extração dos polifosfatos com inativação da fosfatase por aquecimento em micro-ondas;
- Aplicar o método em amostras comerciais de produtos cárneos e pescado;
- Utilizar a eco-escala para avaliar se os métodos propostos estão adequados aos princípios da química verde.

CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA PARA DETERMINAÇÃO DE SULFITO EM AMOSTRAS DE PESCADO

2.1. INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO

2.1.1. Sulfito e agentes sulfitantes

Sulfito e agente sulfitante são termos utilizados para referir-se a compostos que liberam dióxido de enxofre (SO_2), sulfito (SO_3^{2-}) ou bissulfito (HSO_3^-) quando adicionados aos alimentos. Esses agentes são multifuncionais e atuam como conservantes, antimicrobianos, antioxidantes, branqueadores e no controle de reações enzimáticas e não enzimáticas. Por isso são amplamente utilizados em alimentos como pescado, produtos cárneos, vinhos, sucos, geleias, frutas e legumes desidratados entre outros (AUN et al., 2011; FAVERO; RIBEIRO; DE AQUINO, 2011).

Em camarões e outros crustáceos o sulfito é empregado para prevenir a melanose, também conhecida por mancha preta ou ainda *black spots*, que consiste em um processo bioquímico *post mortem* e leva ao aparecimento de manchas escuras ao longo dos corpos dos animais. Este fenômeno ocorre devido à oxidação enzimática de compostos fenólicos que são convertidos a quinonas pela polifenoloxidase, formando melanina (KHAN; LIVELY, 2020). Apesar de não ser prejudicial à saúde dos consumidores, a melanose afeta as características sensoriais e reduz o tempo útil, a qualidade e o valor comercial desses produtos (GONÇALVES; DE OLIVEIRA, 2016). No Brasil, a ANVISA estabelece quais compostos podem ser empregados como agentes sulfitantes em alimentos por meio da instrução normativa nº 211 de 2023 (Tabela 2).

Tabela 2. Agentes sulfitantes permitidos para uso em camarões e outros crustáceos de acordo com a ANVISA

Agente sulfitante	Fórmula molecular	INS*
Dióxido de enxofre	SO ₂	220
Sulfito de sódio	Na ₂ SO ₃	221
Bissulfito de sódio	NaHSO ₃	222
Metabissulfito de sódio	Na ₂ S ₂ O ₅	223
Metabissulfito de potássio	K ₂ S ₂ O ₅	224
Sulfito de potássio	K ₂ SO ₃	225
Sulfito de cálcio	CaSO ₃	226
Bissulfito de potássio	KHSO ₃	228
Tiosulfato de cálcio	CaS ₂ O ₃	539

*INS – *International Numbering System* (Sistema Internacional de Numeração)

Fonte: Adaptado da IN n° 211/2023

Embora os agentes sulfitantes possuam vantagens na conservação de alimentos, já são conhecidos seus potenciais patológicos, como o desencadeamento de reações alérgicas graves, anafilaxia, ataques asmáticos, urticária e outros sintomas recorrentes em indivíduos sensíveis ao sulfito (COLLINS-WILLIAMS, 1983; GONÇALVES; DE OLIVEIRA, 2016). No nosso organismo, o sulfito é inativado pela enzima sulfito-oxidase, que o transforma em sulfato (SO₄), que é biologicamente inerte e prontamente excretado pela urina. A ausência ou diminuição da enzima sulfito-oxidase pode explicar por que alguns indivíduos são mais intolerantes aos agentes sulfitantes do que outros (AUN et al., 2011).

Devido essa problemática os órgãos reguladores estipulam limites de concentração de sulfito em camarões e outros crustáceos que variam conforme seus processamentos. No Brasil, segundo a ANVISA são permitidos camarões e crustáceos contendo concentrações residuais máximas de SO₂ em 100 e 150 mg kg⁻¹ para produtos crus e cozidos respectivamente, e para produtos salgados 30 mg kg⁻¹ (BRASIL, 2023b). Outros países, como na União Europeia, estabelecem limites regulatórios para valores entre 50 e 300 mg kg⁻¹, dependendo do tipo e quantidade de unidades por kg de frutos do mar. A regulamentação dos Estados Unidos exige que o uso de sulfito seja declarado nos rótulos dos alimentos sempre que a concentração residual de SO₂ for superior a 10 mg kg⁻¹ (EUROPEAN COMMISSION, 2015; FDA, 2022).

2.1.2. Métodos para determinação de sulfito

Os sulfitos, quando adicionados aos alimentos, podem permanecer em sua forma livre, podem se ligar de forma reversível ou irreversível a componentes presentes nos alimentos, originando derivados desse aditivo. O sulfito ligado reversivelmente é formado principalmente a partir da reação com compostos carbonilados, açúcares, aldeídos, ácidos orgânicos e substâncias como antocianinas, folatos e derivados de nicotinamida. Esses derivados ligados de forma reversível podem retornar a forma livre a partir do ajuste do pH e aquecimento. O sulfito forma ligações altamente estáveis com compostos aromáticos e alcanos, levando à formação do sulfito irreversivelmente ligado. Essa alta estabilidade torna difícil a sua extração e quantificação, e mesmo sob condições extremas de destilação ácida ou extrações fortemente alcalinas, não é possível recuperar o sulfito que está ligado de forma irreversível. (MACHADO; TOLEDO, 2006; TAYLOR; HIGLEY; BUSH, 1986). A forma livre do sulfito é mais fácil de analisar do que a forma ligada reversivelmente, que requer etapas e processos adicionais. Devido às distintas formas de sulfito e à instabilidade de sua forma livre, diferentes métodos para a determinação desses analitos são relatados (ROBBINS et al., 2015a).

O método volumétrico oficial da AOAC 990.28, conhecido como método otimizado de Monier-Williams, é a abordagem analítica mais utilizada e considerada referência para medição de sulfito. Nesse método a amostra é adicionada em um balão de destilação com ácido clorídrico, onde é aquecida e deixada em refluxo. O sulfito é convertido em SO_2 e conduzido por um fluxo de nitrogênio até uma solução de peróxido de hidrogênio, onde será oxidado a H_2SO_4 . O teor de sulfitos na amostra é determinado por meio da titulação com uma solução de NaOH padronizada (AOAC, 2000). Devido ao seu baixo custo e simplicidade, o método de Monier-Williams tem sido o método analítico mais comumente implementado em laboratórios de controle de alimentos. Porém, mesmo atendendo aos rigorosos requisitos metrológicos da AOAC. Este método possui desvantagens como o emprego de grandes volumes de amostra e reagentes, alta geração de resíduos e longos tempos de análise que prejudicam a frequência analítica.

Métodos alternativos ao Monier-Williams foram propostos para determinação de sulfito, dentre eles estão métodos eletroquímicos (AMATATONGCHAI et al., 2015; WANG et al., 2019; WINIARSKI et al., 2017), espectrofotométricos (FILIK; ÇETINTAŞ, 2012; LENG

et al., 2019), métodos por cromatografia iônica (IAMMARINO; DI TARANTO; IENTILE, 2014a; YOSHIKAWA; UEKUSA; SAKURAGAWA, 2015), cromatografia líquida de alta eficiência (ROBBINS et al., 2015a; THEISEN et al., 2010; YANG et al., 2019) e eletroforese capilar (GONÇALVES et al., 2020; JANKOVSKIENE; DAUNORAVICIUS; PADARAUSKAS, 2001).

Para contornar os problemas devido à alta instabilidade do sulfito diferentes alternativas foram propostas, como o controle do pH (GONÇALVES et al., 2020), determinações indiretas por reações com iodo (JANKOVSKIENE; DAUNORAVICIUS; PADARAUSKAS, 2001), formação de adutos a partir de reações com álcoois, açúcares e piridina (DE CARVALHO; SCHWEDT, 2000, 2005; YANG et al., 2019). Apesar de adequados a maioria desses métodos apresentam dificuldades para implementação em análises de rotina em amostras complexas como camarões e crustáceos.

Uma alternativa para contornar a instabilidade foi proposta por Warner e colaboradores (WARNER et al., 1987) por meio da reação do sulfito com formaldeído para formação do derivado aniônico estável hidroximetilsulfonato (HMS). Em ambientes com pH entre 3 e 7, a espécie HSO_3^- é predominante e a reação com formaldeído gera HMS (Equação 1). A estabilidade HMS é dependente da faixa de pH, que acima de 7 se decompõe.



O HMS tem sido utilizado para a quantificação de sulfito analisado em diversas matrizes de alimentos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) no método oficial da Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos (CARLOS; DE JAGER, 2017; ROBBINS et al., 2015a). Apesar do alto desempenho do LC-MS/MS, tais instrumentos possuem altos custos de aquisição e manutenção, além de geralmente utilizarem grandes volumes de solventes orgânicos tóxicos. Uma alternativa mais simples e barata à análise LC-MS/MS é a eletroforese de zona capilar no modo indireto, que permite a separação de ânions que não absorvem a radiação UV-VIS, como o HMS. Além disso, requer pequenas quantidades de amostras e reagentes, procedimentos simples de preparação de amostras e tempos de análise curtos. No entanto, até o momento, nenhum método baseado em

CZE para determinação de sulfito em frutos do mar, utilizando o derivado HMS, está disponível.

Dentre os trabalhos encontrados na literatura que obtiveram bons resultados utilizando formaldeído, são encontrados somente procedimentos de extração clássicos e com muitas etapas de preparo e limpeza, como a extração sólido-líquido (ROBBINS et al., 2015a). Novas técnicas de extração que possam melhorar a frequência analítica e simplificar os processos são fundamentais em análises de rotina com grandes números de amostras.

2.1.3. Extração líquido pressurizada automatizada

A extração de compostos de interesse em matrizes sólidas pode ser realizada por diferentes procedimentos, que vão desde métodos simples, como a extração sólido-líquido utilizando solventes sob agitação, até técnicas mais avançadas, como separações que fazem uso de solventes pressurizados. A extração por líquido pressurizada (PLE, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*) refere-se a extrações que utilizam solventes sob pressão superior à pressão atmosférica de 1 atm. Isso mantém o solvente abaixo de seu ponto de ebulição atmosférico, garantindo que, mesmo em temperaturas elevadas, o solvente de extração permaneça no estado líquido. A manipulação da temperatura e da pressão altera as características físico-químicas dos solventes, melhorando a eficiência da extração e reduzindo o tempo e o consumo de solventes. Esses atributos destacam a PLE como uma técnica de extração em conformidade com os princípios da química verde (HOFF; PIZZOLATO, 2018).

O sistema Energized Dispersive Guided Extraction (EDGE[®]) é um sistema automatizado que combina a PLE, dispersive solid phase extraction (dSPE) e matrix solid-phase dispersion (MSPD) e foi introduzido pela CEM Corporation em 2017. Nele a amostra é inicialmente misturada com um material dispersante que aumenta a sua superfície de contato e em seguida é extraída pressão (KINROSS et al., 2020). Muitos métodos em diversas matrizes são reportados na literatura e em notas de aplicação da CEM Corporation, principalmente para compostos orgânicos (C.E.M CORPORATION, 2020; DE MELO et al., 2022; HOFF et al., 2022; KINROSS et al., 2020), porém ainda é pouco utilizado para extração de analitos inorgânicos e não encontramos trabalhos que façam os processos de derivatização

concomitantemente a extração como é necessário para manter a estabilidade do sulfito ao longo do processo de análise.

2.2. EXPERIMENTAL

2.2.1. Reagentes e soluções

Foram utilizados reagentes de grau analítico, solventes de grau LC-MS e a água ultra-pura (sistema Milli-Q[®], Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os padrões analíticos utilizados foram sulfito de sódio, ácido malônico, ácido aminocapróico, ácido benzenossulfônico e ácido fórmico foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹ foi fornecido pela Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EUA), ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio pela Êxodo científica (Sumaré, SP, Brasil). Formaldeído foi proveniente da Dinâmica (Indaiatuba, SP, Brasil) e acetonitrila (ACN) e foi obtida na Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha).

A solução estoque de sulfito foi preparada a 10.000 mg L⁻¹ com 3% de formaldeído em água ultra-pura para formar o derivado HMS. A solução padrão interno (PI) foi preparada com ácido malônico em água a 1000 mg L⁻¹. Todas as soluções foram preparadas diariamente. Foram utilizadas duas soluções para a extração conforme o procedimento escolhido. A extração sólido-líquido utilizou uma solução com 0,3% de formaldeído e 70% de ACN e a extração por PLE utilizou uma solução 0,3% de formaldeído e 40% de ACN.

2.2.2. Programas utilizados e tratamento de dados

O desenvolvimento e otimização do método por eletroforese foi realizado com auxílio do *software Peakmaster*[®] versão 5.3 e o tratamento dos dados e as análises estatísticas foi conduzido no *Statistica*[®] 13.0 e no *Excel*, pacote *Office 365*.

2.2.3. Instrumentação e método analítico

As medidas eletroforéticas foram feitas em um equipamento de eletroforese capilar da Agilent Technologies modelo 7100 (Palo Alto, CA, USA) equipado com um detector de arranjo de diodos que abrange de 190 a 600 nm. Os comandos do equipamento assim como a aquisição e tratamento dos dados foram realizados pelo *software ChemStation*[®]. O método CZE-DAD foi adaptado de Gonçalves e colaboradores, 2020.

Para as análises foram empregues capilares de sílica revestidos de poli-imida da Agilent Technologies e da empresa NST (São Carlos, SP, Brasil) com 38,5 cm de comprimento total, 30 cm de comprimento efetivo até o detector e diâmetro interno de 75 μm . As injeções foram realizadas no modo hidrodinâmico com pressão de 50 mbar por 5 segundos. A voltagem constante aplicada para a separação foi de 30 kV com polaridade negativa na extremidade de injeção. A detecção dos analitos foi realizado pelo modo indireto e acompanhado em 210 nm. O eletrólito de corrida composto por 20 mmol L⁻¹ ácido benzenossulfônico e 45 mmol L⁻¹ de ácido amicocapróico, pH = 4,5, foi preparado diariamente em água. As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro modelo 913 da Metrohm (Herisau, Suíça).

Todos os capilares passaram por um condicionamento inicial com pressão de 940 mbar com hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹, água ultrapura e BGE por 30 min cada uma das soluções. Entre as corridas, os capilares foram condicionados com BGE por 1 min.

2.2.3.1. Método comparativo por LC-MS/MS

O espectrômetro de massa híbrido triplo quadrupolo (5500 QTrap), equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) e acoplado ao cromatógrafo líquido de alta performance Exion LC fornecidos pela Sciex (Foster City, EUA), foi usado para avaliar a seletividade do método. As separações cromatográficas foram realizadas em fase reversa utilizando uma coluna com fase estacionária polar cianopropila (4,6 \times 50 mm, 3,5 μm) (Zorbax 300SB-CN, Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). As fases móveis A (solução aquosa com 0,1% de ácido fórmico) e B (ACN com 0,1% de ácido fórmico) foram empregadas em um gradiente de: 0–4 min (95% A), 4–6 min (10% A), 6–7 min (50% A), 7–8 min (95% A) e 2 min para auto equilíbrio do sistema. A análise LC-MS/MS de HMS foi realizada pelo modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) com fonte de ionização negativa (ESI⁻) aplicando: -4500 V (spray de íons), 20 psi (gás de cortina), 60 psi (gás nebulizador e gás de secagem) e 550 °C (temperatura da fonte). O nitrogênio foi usado como nebulizador e gás de colisão. O íon precursor com m/z 110,9 e os íons de fragmento m/z 80,8, 81,8, e 94,0 foram monitorados. Os softwares Analyst e MultiQuant (Sciex, Framingham, EUA) foram utilizados para controle do sistema, aquisição de dados e análise.

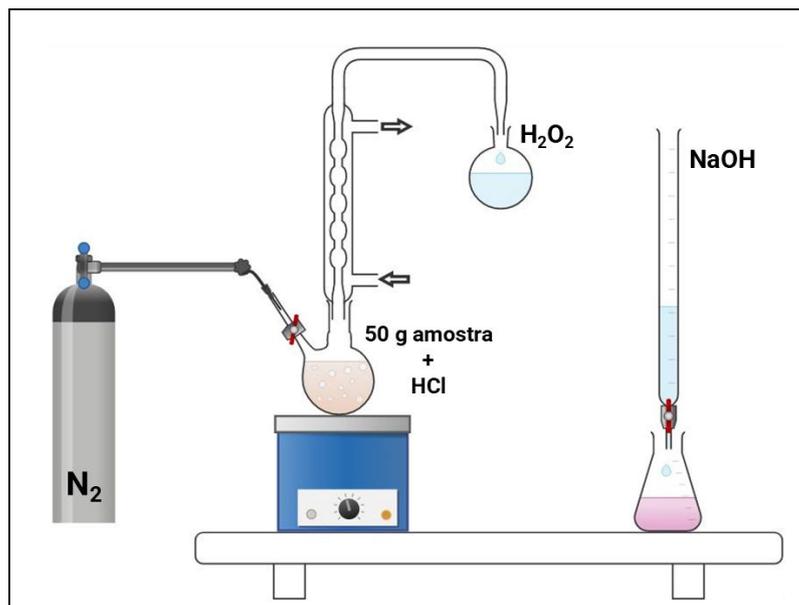
2.2.3.2. Método comparativo Monier Williams

Em um balão de fundo redondo de 2 L foram adicionados 50 g de amostra, 350 mL de água morna, 90 mL de ácido clorídrico 4 mols L⁻¹ e esferas de vidro. Peróxido de hidrogênio 3% (40 mL) foi adicionado a um frasco recipiente contendo vermelho de metila como indicador. O frasco contendo a amostra foi aquecido em uma manta sob fluxo suave de nitrogênio (Figura 5). Após ferver a amostra por 100 min, o frasco com a solução receptora foi desconectado do sistema de destilação. A solução foi titulada com hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ cuja concentração real foi padronizada com biftalato de potássio (AOAC, 2000). O teor de sulfito (em mg de SO₂ kg⁻¹ de amostra de alimento) foi determinado por:

$$SO_2(mg\ kg^{-1}) = \frac{32,03 \cdot v \cdot c_a \cdot 1000}{w} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde 32,03= peso miliequivalente de SO₂, v= volume (mL) necessário para a titulação, c_a= concentração de NaOH e w = peso (g) da amostra adicionada ao balão de fundo redondo.

Figura 5. Representação esquemática de sistema destilação para o método Monier-Williams



Fonte: Elaborado pela autora

2.2.4. Desenvolvimento do método

2.2.4.1. Medidas de mobilidade

A mobilidade iônica (μ_{0,A^-}) do HMS foi calculada usando o tempo de migração experimental nas condições de separação instrumental. Primeiramente, a mobilidade real (μ_{act}) foi calculada utilizando a Equação (3):

$$\mu_{act} = \frac{L_{det} \cdot L_{tot}}{t_a \cdot V} - \mu_{EOF} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde, L_{det} = comprimento efetivo do capilar (até o detector), L_{tot} = comprimento total do capilar, t_a = tempo de migração do analito, V = tensão aplicada e μ_{EOF} = mobilidade do fluxo eletrosmótico. Em seguida, o valor de μ_{act} foi corrigido pela equação de Onsager considerando a força iônica (I) do BGE (Equação 4) (COSTA et al., 2008):

$$\mu_{act} = \mu_{0,A^-} - [0.23\mu_{0,A^-} + 31.3 \times 10^{-5}] \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \quad (\text{Equação 4})$$

2.2.4.2. Otimização e formação do HMS

Seis diferentes concentrações de formaldeído usado para a derivatização do sulfito foram avaliadas em amostras de camarão brancas (isentas do analito), extrato de matriz branca de camarão e em solvente, fortificadas com sulfito em dois níveis de concentração (30 mg kg⁻¹ e 150 mg kg⁻¹). As concentrações de formaldeído avaliadas foram 0,05%, 0,10%, 0,20%, 0,30%, 0,50% e 1,0% (v/v). Extratos de matriz em branco foram preparados com 5 g de camarão e 10 mL de ACN 70%. A extração foi realizada conforme procedimento descrito no item 2.2.5.1. A concentração final do PI foi de em 50 mg kg⁻¹ e a concentração final de ACN em todas as soluções analisadas foi de em 14%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.4.3. *Otimização dos materiais dispersantes e filtros para extração por PLE automatizado*

Inicialmente foram realizados ensaios univariados para comparar materiais dispersantes (celulose, cortiça e terra diatomácea) e filtros para a extração automatizada de sulfito. Os materiais foram comparados quanto à sua capacidade de dispersar as amostras e quanto à presença de possíveis interferentes na separação eletroforética.

Sete diferentes filtros e combinações de filtros foram testados conforme recomendações do fabricante do sistema de extração automatizada (CEM Corporation): filtros de celulose 2.5 μm (C1 Q-disc[®]), 7.0 μm (C3 Q-disc[®]), 11.0 μm (C4 Q-disc[®]) e 20.0 μm (C7 Q-disc[®]), filtro de membrana 0.25 μm (M1 Q-disc[®]) e as combinações de filtro de membrana 0.25 μm e filtro de celulose 40 μm (M2 Q-disc[®] + C9 Q-disc[®]) e filtros de celulose e filtro de fibra de vidro 0.3 μm (C9 Q-disc[®] + G1 Q-disc[®] + C9 Q-disc[®]).

Os ensaios foram realizados por meio da extração em triplicata de 5.0 ± 0.1 g de amostra branca e 2.0 ± 0.1 g de material dispersante, fortificadas em 100 mg kg^{-1} de sulfito e com posterior adição de malonato (I.S) 40 mg kg^{-1} . As razões de área do pico do analito com a área do pico do I.S para cada filtro testado foram comparadas por análise de variância (95%). Para ambos os testes foram adicionados volumes de 30 mL de solução extratora/derivatizante 70% ACN com 0.3 % formaldeído a cada amostra, seguindo-se de aquecimento a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min (GONÇALVES et al., 2022).

2.2.4.3.1. *Otimização multivariada dos parâmetros da extração por PLE automatizado*

Um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} avaliou os efeitos das variáveis porcentagem de acetonitrila (40% a 70%), temperatura de extração (70°C a 110°C), tempo de extração (2 a 10 min) e quantidade de dispersante (1 a 3 g de terra diatomácea). No total, foram realizados oito experimentos em triplicata, de forma aleatória (Tabela 3). A concentração do analito foi mantida constante em 150 mg kg^{-1} nas amostras brancas fortificadas com sulfito. A concentração final do padrão interno foi de 40 mg kg^{-1} . As razões de área dos picos do sulfito e do PI obtidas no planejamento fatorial foram avaliadas pelo gráfico de Pareto.

Tabela 3. Tabela com níveis e fatores para planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} para otimização da extração de HMS por PLE automatizado

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
ACN (%)	40	55	70
Temperatura (°C)	70	90	110
Tempo (min)	2	6	10
Dispersante (g)	1	2	3

Ensaio n°	ACN (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Dispersante (g)
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

Após o planejamento fatorial fracionado, foi realizado planejamento Box-Behnken (Tabela 4) para avaliar as variáveis temperatura (80 °C a 120 °C), porcentagem de acetonitrila (20% a 60%) e tempo de extração (5 a 15 min). As condições finais de extração foram definidas com 15 experimentos. As razões de área dos picos do sulfito e do PI obtidas com o planejamento Box-Behnken foram avaliadas por gráficos de superfície de resposta.

Tabela 4. Tabela com níveis e fatores para planejamento Box-Behnken para otimização da extração de HMS por PLE automatizado

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Acetonitrila (%)	20	40	60
Temperatura (°C)	80	100	120
tempo (min)	5	10	15

Ensaio n°	ACN (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	-1	0	-1
2	+1	0	-1
3	-1	0	1
4	+1	0	1
5	-1	-1	0
6	+1	-1	0
7	-1	+1	0
8	+1	+1	0
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

2.2.5. Amostras

Doze amostras de camarão e lagosta de estabelecimentos inspecionados foram utilizadas. Amostras de camarões de cultivo, sem o uso de qualquer conservante, foram doadas pelo Laboratório de camarões marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e utilizadas como branco analítico. As amostras foram armazenadas a -20 °C até a análise.

2.2.5.1. Preparo da amostra por extração sólido-líquido

As amostras foram moídas e homogeneizadas em um triturador Blixer[®]3 (Robot Coupe, Paris, França). Alíquotas de $5,0 \pm 0,1$ g foram pesadas em tubos de polipropileno de 50 mL, aos quais foram adicionados 10 mL da solução extratora e derivatizante contendo 0,3% de formaldeído e 70% de ACN. Os tubos foram agitados e seu conteúdo foi homogeneizado com

um disruptor de tecidos (Ultra Turrax T18 basic, IKA, Staufen, Alemanha), sonicadas a 60 kHz a 25 °C por 8 minutos e depois aquecidas a 90 °C em banho-maria por 10 minutos. A eficiência de extração de sulfito livre e ligado reversivelmente foi comparada submetendo os mesmos extratos ao procedimento com e sem aquecimento e sonicação. A comparação foi feita por *teste t* (probabilidade de 95%). Por fim, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 4°C e 4500 rpm. Alíquotas do sobrenadante foram diluídas com PI cuja concentração final foi fixada em 50 mg kg⁻¹. Os extratos foram então transferidos para frascos de polipropileno e analisados por CZE-DAD (Figura 6A).

2.2.5.2. Preparo da amostra por extração PLE automatizada

As análises por PLE foram realizadas no sistema automatizado “Energized Dispersive Guided Extraction” (EDGE[®]) fabricado pela CEM Corporation (Matthews, NC, USA). As extrações foram feitas com 5.0 ± 0.1 g de amostras de camarão e 3 g de terra diatomácea. As amostras foram homogeneizadas e transferidas para tubos de alumínio (Q-cup[®], CEM Corporation), aos quais foram adicionados um filtro de fibra de vidro 0.3 µm (G1 Q-disc[®], CEM Corporation) e dois filtros de celulose 40 µm (C9 Q-disc[®]) dispostos na sequência C9+G1+C9. As amostras foram extraídas com 30 mL de uma solução 40% ACN e 0,3% de formaldeído por 5 min à temperatura de 96 °C. Os extratos foram coletados em tubos de polipropileno de 50 mL e deixados por 20 min a -20°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados 4500 rpm a 4 °C por 10 min. Uma alíquota do sobrenadante foi diluída com padrão interno, de forma que sua concentração fosse 40 mg kg⁻¹. Os extratos foram então transferidos para *vials* de polipropileno e analisados por eletroforese capilar de zona (Figura 6B).

Figura 6. Representação esquemática do preparo de amostra utilizando a extração sólido-líquido (A) e extração líquido pressurizada automatizada (B).



Fonte: Elaborado pela autora

2.2.6. Validação analítica

Foram realizados dois ensaios de validação, para o método utilizando a extração sólido-líquido e para a extração por PLE automatizada. As validações foram executadas de acordo com as orientações do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (BRASIL, 2020) e AOAC (do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*) (AOAC, 2016) em termos de seletividade, linearidade, efeitos de matriz, precisão, recuperação, estabilidade do analito no extrato, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). A incerteza padrão expandida foi calculada de acordo com a norma ISO 21748 (ISO, 2017).

2.2.6.1. Seletividade

A seletividade para os dois procedimentos de extração foi verificada pela análise de dez amostras em branco de camarão. Este procedimento teve como objetivo avaliar possíveis interferências endógenas e exógenas (cloreto, sulfato, trimetafosfato, tripolifosfato, pirofosfato, ortofosfato, citrato e lactato), contaminação entre corridas e efeitos indesejáveis da derivatização no capilar e nos eletroferogramas. Os resultados foram verificados quanto à presença de sinais interferentes em torno dos tempos de migração do analito e do PI malonato. Corridas de amostras em branco, com e sem fortificação, foram comparadas. Os extratos também foram analisados por LC-MS/MS para assegurar a concordância dos resultados quanto à presença ou ausência do analito e verificar formação do HMS a partir da derivatização do sulfito com formaldeído.

2.2.6.2. Linearidade e efeito de matriz

A avaliação da linearidade e do efeito de matriz foi feita utilizando três diferentes tipos de curvas de calibração com padronização interna: (I) Curva de calibração em solução, preparado em solvente e fortificada com o analito por meio de diluições sequenciais da solução estoque padrão, (II) Curva de calibração em matriz branca, preparada por fortificação do analito diretamente em uma matriz isenta do analito e (III) Curva de calibração em extrato de matriz

branca, preparada a partir do extrato de uma matriz branca e fortificada com o analito por meio de diluições sequenciais da solução estoque padrão. As curvas de calibração continham seis níveis de concentração, incluindo o zero, na faixa 25 a 200 mg kg⁻¹, visando incluir os limites regulamentares de 100 e 150 mg kg⁻¹ para amostras frescas e cozidas, respectivamente. Todas as curvas analíticas foram preparadas em triplicata para cada nível de concentração.

O efeito de matriz foi avaliado pela comparação das razões das inclinações das diferentes curvas analisadas. De acordo com (HOFF et al., 2015), se as razões de inclinação estivessem entre 0,9 e 1,1, os efeitos de matriz poderiam ser desprezados.

A linearidade foi avaliada pela reprodutibilidade de curvas preparadas em matriz com três réplicas (n = 3) em três dias diferentes e com dois analistas diferentes. O critério de aceitação foi a média dos coeficientes de determinação (R²), que deve ser de pelo menos 0,99, a distribuição dos resíduos e a significância da regressão linear através do teste F. A incerteza padrão da interpolação do sinal analítico no modelo de calibração também foi estimada.

2.2.6.3. *Precisão e Exatidão*

A exatidão avaliada pela recuperação e as precisões (repetibilidade e precisão intermediária) foram determinadas por meio da análise da matriz em branco fortificada em três níveis (50, 100 e 150 mg kg⁻¹) com sete replicatas independentes para cada nível, injetados aleatoriamente e repetindo os preparos ao longo de três dias diferentes de análise com dois analistas diferentes. Os resultados foram calculados usando curvas de calibração em matriz branca preparadas em triplicata e analisadas no mesmo dia. Os parâmetros foram calculados com Anova de fator único com nível de significância de 95%.

2.2.6.4. *Incerteza de medição*

A incerteza de medição foi estimada pela soma ponderada das incertezas individuais de acordo com a norma ISO 21748:2017. As fontes de incerteza identificadas, avaliadas e posteriormente quantificadas foram pesagem de amostras, processos de diluição e interpolação de sinais analíticos no modelo de calibração. Efeitos aleatórios do instrumento e do processo analítico foram considerados após a exclusão de outliers pelo teste de Dixon (95%). A incerteza

padrão expandida (U) foi obtida multiplicando-se a incerteza padrão combinada pelo fator de abrangência ($k = 2,0$), com base na distribuição t de Student (95%).

2.2.6.5. *Limites de detecção, quantificação e estabilidade*

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados com base na relação sinal/ruído (LOD, sinal/ruído ≥ 3 ; LOQ, sinal/ruído ≥ 10).

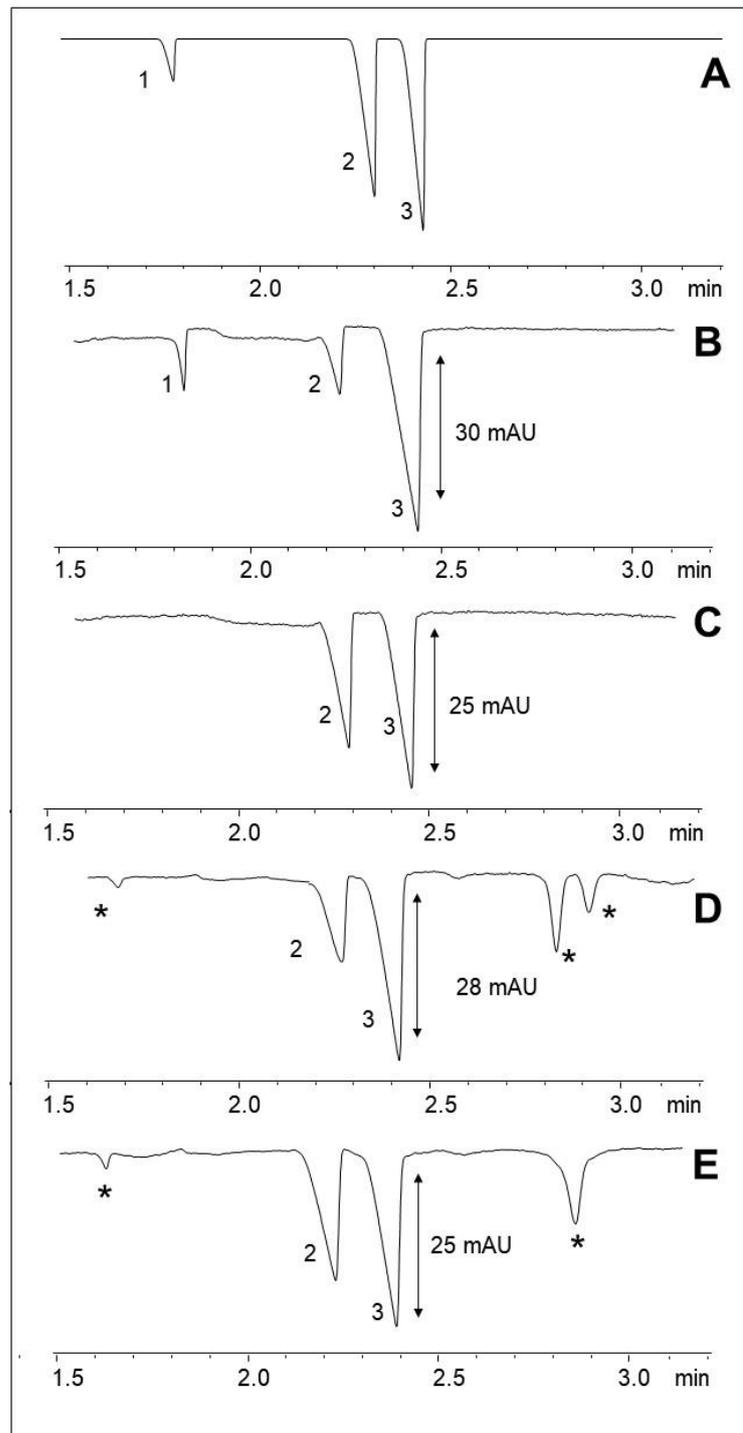
A estabilidade do extrato armazenado sob refrigeração de 0 a 8°C foi avaliada ao longo de até dez dias. Foram monitorados seis extratos de matriz branca fortificada com sulfito (100 mg kg⁻¹). As concentrações do analito foram calculadas com curvas de calibração em matriz, preparadas e analisadas a cada dia do experimento.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Otimização do método do método de separação

HMS é um ânion monovalente em uma ampla faixa de pH ($pK_{a1} = -1,85$; $pK_{a2} = 12,95$) (CHEMAXON, 2022). Assim como o seu precursor sulfito, o HMS não possui absorvibilidade molar na região do UV-Vis e necessita de um método com modo de detecção indireta por CZE-DAD. Para determinar as melhores condições de separação e detecção do HMS por CZE-DAD utilizando o software *Peakmaster*[®] foi calculada a mobilidade iônica experimental do HMS, uma vez que a mobilidade desse analito não consta no banco de dados e seu valor é necessário para otimizar os parâmetros do método. O valor da mobilidade iônica encontrada para o HMS foi de $-43,2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e está próximo do valor de mobilidade do sulfito $-51,8 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Considerando as semelhanças descritas entre o HMS e o sulfito, as otimizações da separação foram conduzidas a partir do método de CZE-DAD proposto por Gonçalves e colaboradores (GONÇALVES et al., 2020). O BGE composto por ácido benzenossulfônico 20 mmol L⁻¹ e ácido aminocaprílico 45 mmol L⁻¹, pH 4,5, garantiu resultados satisfatórios para os parâmetros de separação, como a força iônica (20,0 mmol L⁻¹) e a capacidade tampão (25,4 mmol L⁻¹). Valores de dispersão por eletromigração (EMD, do inglês “*electromigration dispersion*”) iguais a zero levam a picos simétricos. A EMD obtida para o HMS foi de $0,7 \times 10^{-3} \text{ S m}^2 \text{ mol}^{-1}$, o que levou a uma dispersão com cauda frontal dos picos (*fronting*) (Figura 7). No entanto, valores de EMD até $\pm 3,0 \times 10^{-3} \text{ S m}^2 \text{ mol}^{-1}$ ainda são adequados e não comprometem a separação (DOLZAN et al., 2013).

Figura 7. Eletroferogramas com sulfito (1) hidroximetilsulfonato – HMS (2), ácido malônico – padrão interno (3) e sinal desconhecido (*). (A) simulação no software Peakmaster; (B) solução padrão de sulfito 150 mg kg⁻¹ derivatizada com formaldeído 0,003%; (C) solução padrão de sulfito 150 mg kg⁻¹ derivatizada com formaldeído 0,3%; (D) curva de calibração em matriz em 100 mg kg⁻¹; (E) amostra de camarão analisada.



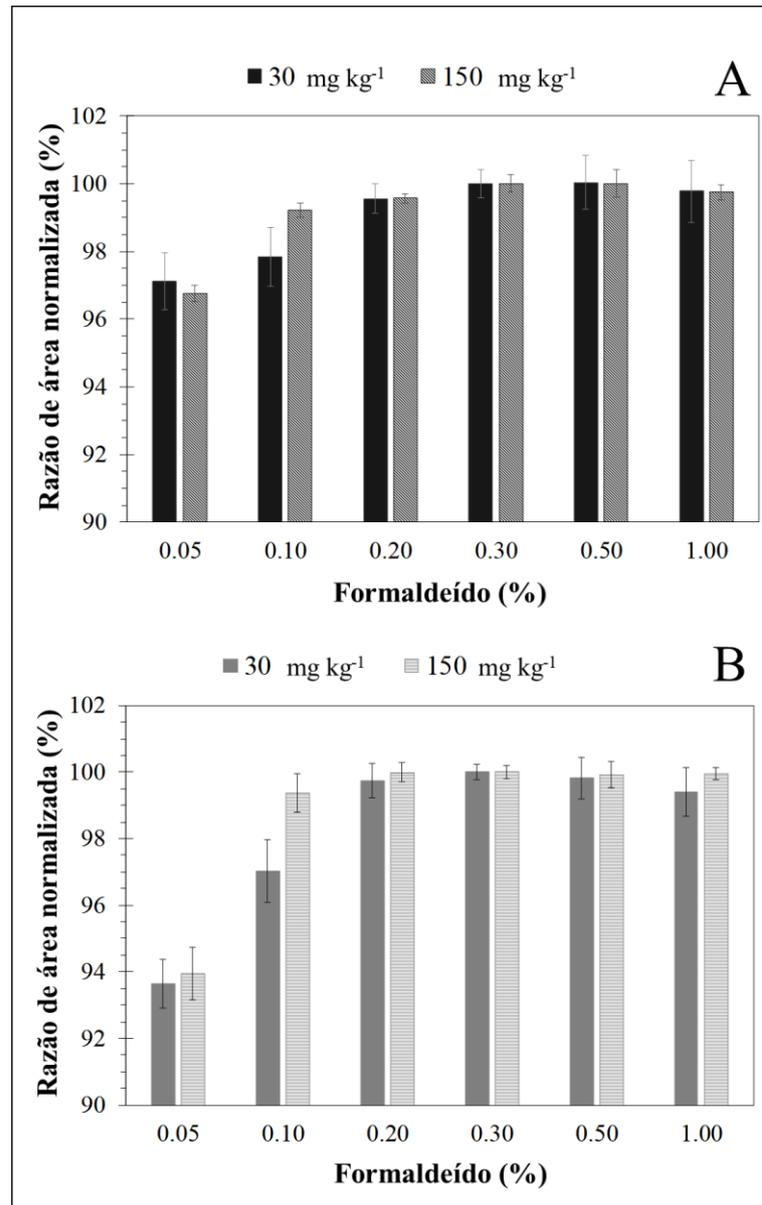
Fonte: Elaborado pela autora

As condições de separação foram favoráveis para a análise, uma vez que o pH do meio auxiliou na estabilidade do HMS e o fluxo eletrosmótico (EOF) teve pouca influência no tempo de migração devido a sua baixa mobilidade ($< 10 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (VITALI; FÁVERE; MICKE, 2011). O *Peakmaster*[®] permitiu simular e otimizar a separação com poucos experimentos, economizando reagentes e tempo (Figura 7A). O eletroferograma simulado pelo *Peakmaster*[®] foi comparado com eletroferogramas experimentais, confirmando que as condições selecionadas eram adequadas para o HMS (Figura 7B, 7C, 7D e 7E). A separação ocorreu em menos de 3 min, sendo esse tempo inferior a outros métodos de separação cromatográficos como os descritos por Robbins e colaboradores (ROBBINS et al., 2015) por LC-MS/MS e pelo método da AOAC 990.31–1995) (AOAC, 1995), que precisam de pelo menos 10 minutos para separação. O tempo total da corrida foi de aproximadamente 5 minutos, incluindo condicionamento capilar entre as corridas, troca de frascos pelo equipamento, injeção da amostra e separação do analito. Assim, método proposto neste trabalho permite que os laboratórios de controle alcancem maior rendimento analítico na quantificação de sulfito do que outros métodos de separação.

2.3.2. Formação do HMS

A reação de derivatização sulfito com formaldeído evitou sua rápida oxidação a sulfato no meio aquoso, sendo uma etapa decisiva da análise. O método ser capaz de separar sulfito e HMS na mesma corrida tornou possível a avaliação da derivatização, pois a presença de um pico de sulfito representaria derivatização incompleta, como demonstrado na figura 7B onde a concentração de formaldeído utilizada foi de 0,003%. Na literatura o formaldeído tem sido usado para formar HMS em concentrações de 0,2% a 2,0% (CARLOS; DE JAGER, 2017; ROBBINS et al., 2015a; WARNER et al., 1987, 1990). Os resultados dos experimentos para avaliar a concentração ideal de formaldeído corroboram com esses autores, porque as melhores respostas foram obtidas quando a concentração de formaldeído era igual ou superior a 0,2% (Figura 8). Quando testada a menor concentração de formaldeído (0,05%), o sinal analítico do HMS foi baixo tanto nos ensaios feitos em solvente quanto em matriz.

Figura 8. Gráficos da porcentagem de formaldeído versus razões de área de pico normalizada (HMS/PI) em dois níveis de concentração (30 e 150 mg kg⁻¹). (A) ensaio realizados em solvente (70% ACN); (B) ensaio realizado em amostra branca de camarão.

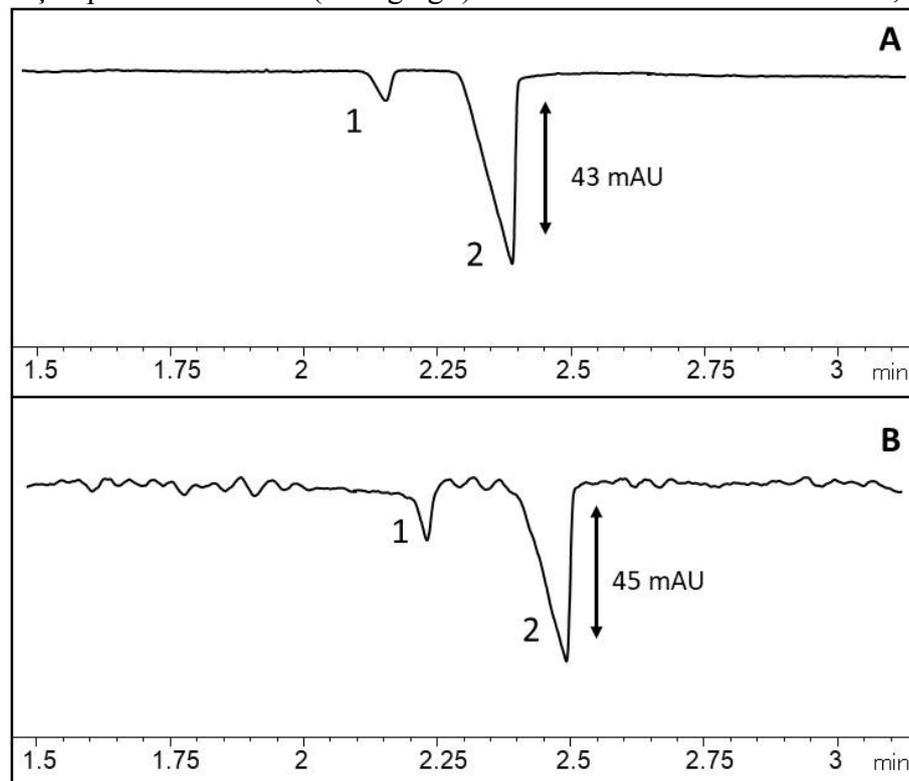


Fonte: Elaborado pela autora

Quando a concentração de formaldeído foi maior (1,0%), houve alterações na linha de base e no ruído dos eletroferogramas indicando que há prejuízos na separação quando utilizadas concentrações mais altas de formaldeído. Todas as concentrações de formaldeído testadas estavam em excesso para promover a derivatização completa do sulfito, o que foi confirmado

pela ausência do sinal do sulfito nos eletroferogramas, em todas as condições avaliadas. Assim, a concentração ótima de formaldeído foi fixada em 0,3%, pois gerou a resposta máxima para todas as combinações de matriz e/ou sulfito, sem alterações nos eletroferograma (Figura 9).

Figura 9. Eletroferogramas com hidroximetilsulfonato (1) e padrão interno do íon malonato (2). (A) solução padrão de sulfito (30 mg kg^{-1}) derivatizada com formaldeído 0,3%; (B) solução padrão de sulfito (30 mg kg^{-1}) derivatizado com formaldeído 1,0%.



Fonte: Elaborado pela autora

2.3.3. Preparo das amostras

2.3.3.1. Preparo por extração sólido-líquido

O preparo de amostras de alimentos em métodos de separação costuma ser uma tarefa difícil, pois se trata de misturas complexas que dificultam a realização de procedimentos de extração como transferência de massa, limpeza e derivatização de analito, o que pode comprometer a precisão de um método analítico. Na determinação de sulfito, ainda mais desafios são enfrentados, pois o analito pode estar reversível ou irreversivelmente ligado a várias macromoléculas, como compostos carbonilados, açúcares e proteínas. Quando o sulfito

está irreversivelmente ligado torna-se altamente estável e sua quantificação é dificultada (TAYLOR; HIGLEY; BUSH, 1986). A extração de sulfito ligado reversivelmente pode ser favorecida pela implementação de procedimentos como sonicação e aquecimento. Sonicação por pelo menos 8 min e aquecimento acima de 80 °C foram relatados para extração de sulfito com e sem derivatização. (CARLOS; DE JAGER, 2017; GONÇALVES et al., 2020; ROBBINS et al., 2015a).

Inicialmente foi proposto um processo de extração sólido-líquido simples a partir dos resultados obtidos por Gonçalves e colaboradores (2020) e Robbins e colaboradores (2015) com sonicação de 8 min e aquecimento da amostra a 90°C por 10 min. Como esperado, observou-se um aumento significativo do sinal analítico ($p < 0,05$) após a inserção dessas duas etapas no procedimento de extração.

Foram testadas diferentes massas de amostras (2 g, 3 g e 5 g) e diferentes volumes de solução extratora contendo formaldeído (5 mL e 10 mL). A melhor combinação entre massa e volume de solução extratora foi definida considerando o sinal analítico (área de pico) de amostras com concentrações de HMS próximas aos limites regulamentares para sulfito. Massas de 5 g de amostra e volumes de 10 mL de solução extratora forneceram sensibilidade suficiente para o propósito do método. A solução extratora com 70% de ACN promoveu precipitação efetiva de proteínas, auxiliando no aumento da durabilidade dos capilares utilizados para a separação.

O pH do meio reacional na derivatização deve ser mantido entre 3,0 e 7,0 para garantir a estabilidade do HMS, que se mantém como a espécie predominante nesta faixa de pH. O pH dos extratos submetidos a extração sólido, desde o tempo zero até o último dia de avaliação, mantiveram-se estáveis em $6,36 \pm 0,13$, dispensando a necessidade de tamponamento ou qualquer outro ajuste para manter estável o HMS. Comparado a outras preparações de amostras e métodos de derivatização de sulfito, este método é simples e rápido, exigindo apenas 30 min para a extração e derivatização simultâneas do analito (incluindo o tempo necessário para as etapas de sonicação, aquecimento e centrifugação). Outros métodos como a derivatização pós-coluna requerem aparato específico e controle detalhado da reação de derivatização, com o método de referência LC-MS/MS da FDA (ROBBINS et al., 2015a) que utiliza extração em fase sólida, além das aquecimento e sonicação da amostra.

2.3.3.2. Preparo das amostras por PLE automatizado

2.3.3.2.1. Otimização do material dispersante e filtros

Visando desenvolver um preparo de amostras com poucas etapas, automatizado e capaz de extrair o sulfito livre e ligado reversivelmente, foi proposto um novo preparo de amostra utilizando um sistema PLE automatizado, EDGE[®]. Para uma grande quantidade de analitos orgânicos são reportados métodos usando EDGE[®] e sugestões de condições de extração pelo próprio fabricante. Porém, para analitos inorgânicos, como sulfito, pouco material foi reportado na literatura e processos envolvendo derivatizações ao longo do processo de extração não foram encontradas. Por isso os parâmetros tiveram que ser otimizados a partir de dados referentes a outros tipos de extração a fim de encontrar as melhores condições para a extração do sulfito derivatizado com formaldeído.

Para a extrair o analito utilizando o sistema EDGE[®] é necessário utilizar um material dispersante. Sem o dispersante não é possível extrair adequadamente a amostra, pois devido a temperatura e presença de solvente orgânico a amostra torna-se rígida e a solução extratora não é capaz de permear toda a amostra, apenas sua superfície como mostrado na Figura 10A. Por isso a extração no EDGE[®] inicia-se com um processo similar à MSPD, onde a amostra é rompida e dispersa em uma fase sólida abrasiva para depois ser exposta a solução de extração.

Figura 10. Amostras brancas de camarão após extração pelo EDGE[®]. (A) amostra branca sem dispersante; (B) amostra branca com terra diatomácea; (C) amostra branca com celulose e (D) amostra branca com cortiça

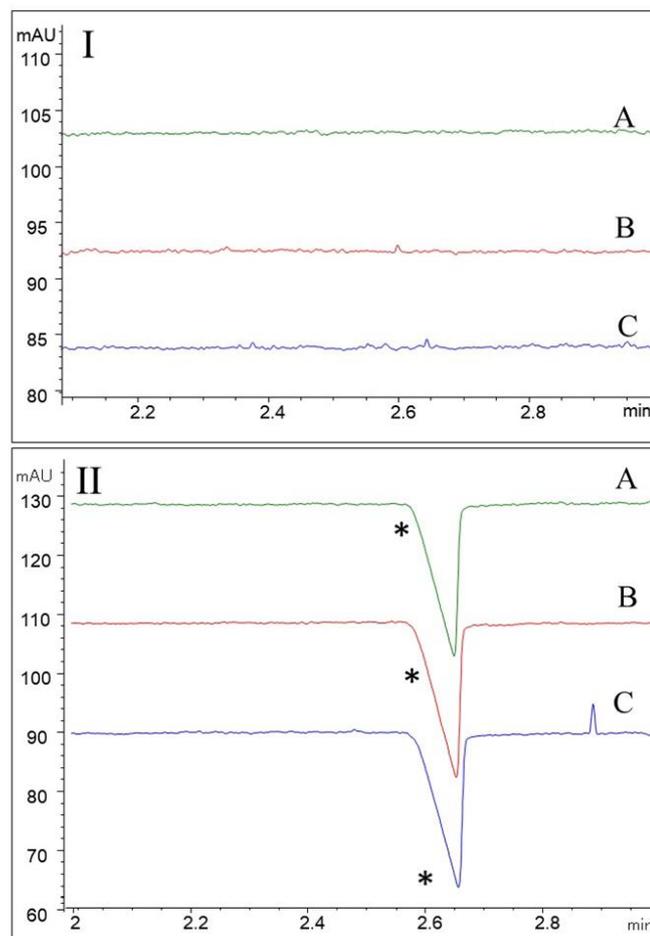


Fonte: Elaborado pela autora

Os três materiais dispersantes testados extraídos individualmente (cortiça, celulose e terra diatomácea) não apresentaram nenhum sinal interferente nos eletroferogramas que pudesse prejudicar a seletividade e os resultados da análise de sulfito por eletroforese capilar

(Figura 11). A capacidade de dispersar as amostras de camarão foi diferente entre os materiais (Figura 10B, 10C e 10D). Visualmente a terra diatomácea foi o material que melhor dispersou a amostra de camarão, levando em consideração sua menor granulometria após extração. A celulose também foi capaz de dispersar a amostra de camarão, porém apresentou grânulos maiores. A cortiça não foi capaz de dispersar bem as amostras, além de visivelmente aglutinar com a amostra de camarão formando blocos. Com base nos resultados e nos trabalhos descrevendo o uso da terra diatomácea como material dispersante (HOFF; PIZZOLATO, 2018; KINROSS et al., 2020), esta foi escolhida para o método de extração.

Figura 11. (I) Eletroferogramas sem sulfito e sem padrão interno; (II): Eletroferogramas sem sulfito e com padrão interno 50 mg kg^{-1} . (A) Extrato de amostra branca dispersa com terra diatomácea; (B) Extrato de amostra branca dispersa com celulose e (C) Extrato de amostra branca dispersa com cortiça. (*) Sinal do padrão interno (malonato).



Fonte: Elaborado pela autora

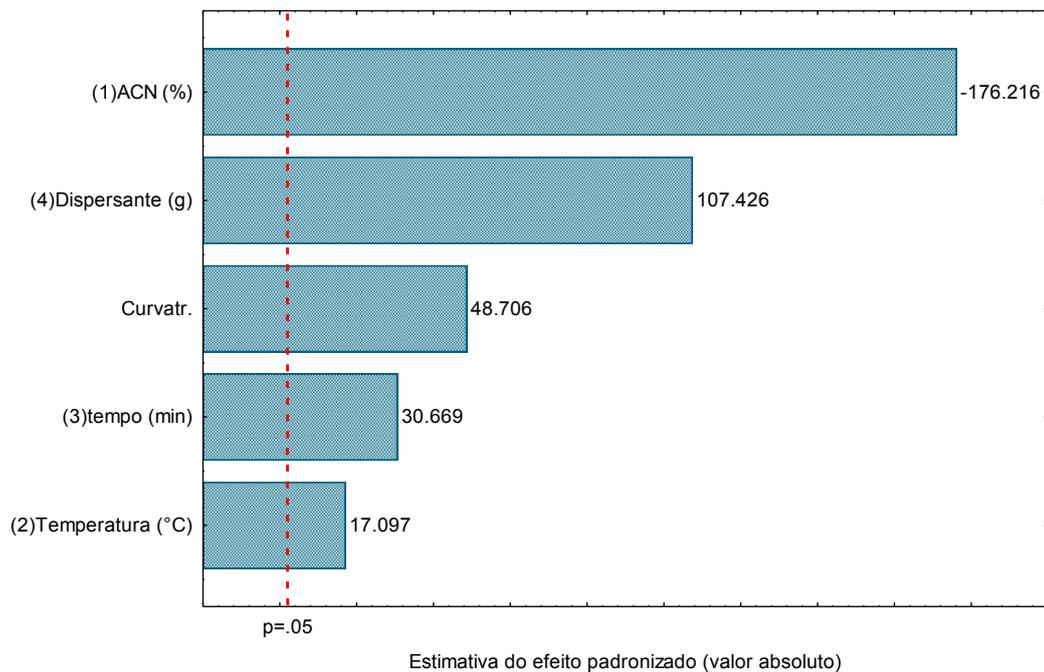
Dos sete filtros avaliados, apenas o M1 Q-disc® não foi capaz de filtrar o extrato devido entupimentos gerados no equipamento. Esse problema provavelmente ocorreu devido falta de compatibilidade do filtro com o solvente utilizado. Não é possível inferir sobre as causas uma vez que os materiais do EDGE® são patenteados e poucas informações são divulgadas. Entre os filtros de celulose não houve diferença significativa entre as razões de área do sulfito extraído ($p = 0.93$) e não houve diferença comparando os quatro filtros de celulose e o filtro combinado M2 Q-disc® + C9 Q-disc® ($p=0.13$). Os valores de razão de área para cada encontram-se no apêndice A. Porém, as razões de área de sulfito utilizando o filtro combinado C9 Q-disc® + G1 Q-disc® + C9 Q-disc® foram maiores do que para os outros filtros testados. Esse aumento na razão de área indicou uma diferença significativa ($p = 0.015$) entre a quantidade de sulfito extraído e devido esse aumento o filtro com a combinação C9 Q-disc® + G1 Q-disc® + C9 Q-disc® foi escolhido. Essa combinação de filtros utilizado no EDGE® traz ganho em relação a limpeza do extrato da amostra quando comparado ao extrato obtido na extração sólido-líquido que não passa por nenhum processo semelhante.

2.3.3.2.2. Planejamento experimental multivariado para otimização dos demais parâmetros do EDGE

Os outros parâmetros da extração pelo EDGE®, temperatura, % ACN, quantidade de terra diatomácea e tempo de extração foram estudados por meio de um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} (Tabela 3) e avaliadas pelo gráfico de Pareto (Figura 12). As faixas inicialmente estudadas foram escolhidas com base em extrações sólido-líquido com formaldeído 0,3%. A % ACN na extração da amostra foi variada de 40 a 70%, e o solvente orgânico foi utilizado para precipitação das proteínas presentes na solução, uma vez que durante as análises essas se ligam irreversivelmente ao capilar de sílica e comprometem a separação. Concentrações acima de 70% de ACN não foram investigadas pois não solubilizam o analito. A elevação da temperatura em torno de 90 °C é necessária para romper a ligação reversível do sulfito com compostos carbonilados da matriz, e liberar o sulfito para se ligar ao formaldeído da solução e formar o HMS. Foram selecionados valores entre 70 e 110 °C. O tempo de extração foi avaliado de 2 a 10 minutos e a massa de terra diatomácea foi avaliada entre 1 e 3 g.

O gráfico de Pareto mostra que todas as variáveis apresentam influência significativa no processo de extração, em um nível de confiança de 95%. Além disso, a curvatura foi significativa, indicando que foi escolhido um bom intervalo de observação. Os efeitos do tempo de extração, temperatura e massa de dispersante mostraram que quanto mais próximo dos valores máximos (10 minutos, 110 °C e 3 g) melhor a resposta da extração. A % ACN apresentou um valor negativo, mostrando que porcentagens mais próximas do mínimo (40%) têm um melhor efeito sobre a extração do sulfito. A utilização de massas maiores que 3 g de terra diatomácea não foi viável pois excederia a capacidade máxima do compartimento da amostra para a extração. Por esse motivo foi definida a utilização de 3 g de terra diatomácea.

Figura 12. Gráfico de Pareto obtido das interações principais entre as variáveis porcentagem de acetonitrila, massa de dispersante, tempo, temperatura e checagem da curvatura para o planejamento fracionado 2^{4-1} . Os efeitos que ultrapassam a linha de $p=0,05$ são estatisticamente significativos sobre a resposta analítica com 95% de confiança. $R^2 = 0,846$

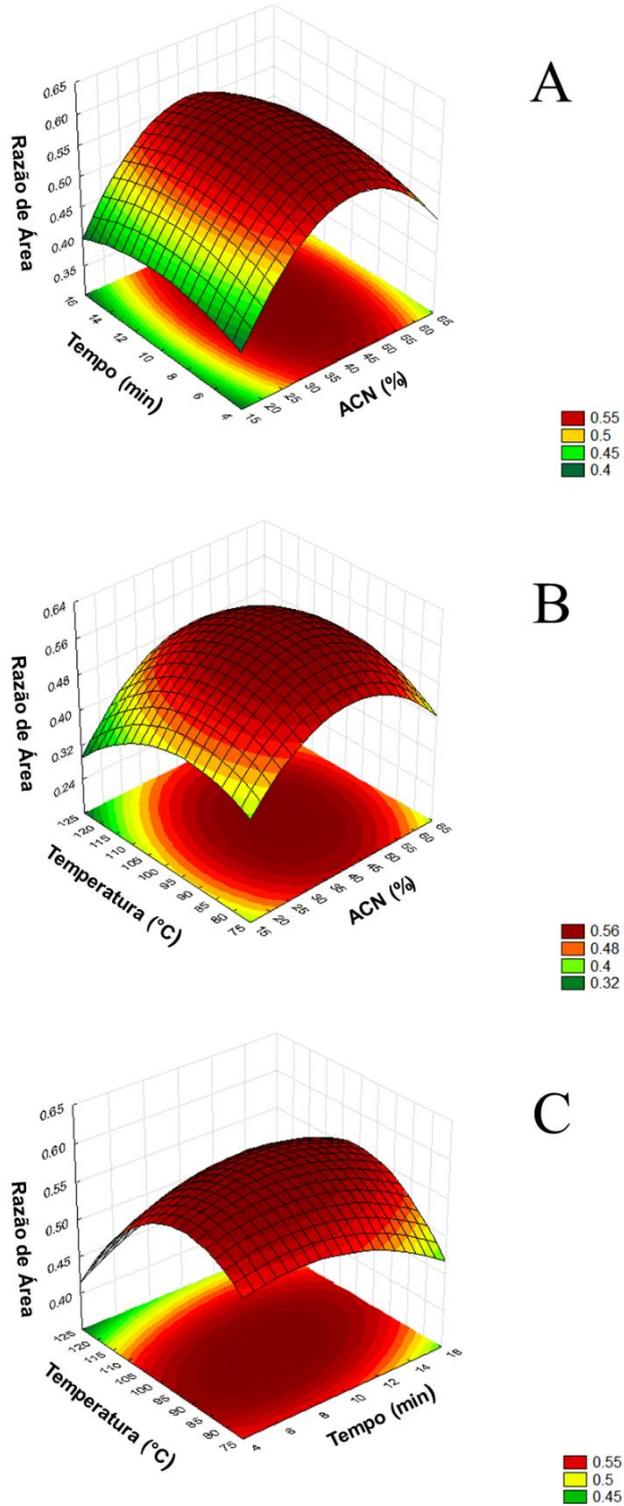


Fonte: Elaborado pela autora

Após a triagem foi realizado um planejamento Box-Behnken para determinar as condições finais de extração. As superfícies de resposta (Figura 13) foram obtidas através de um modelo matemático quadrático com R^2 de 0,891 e os resíduos seguiram uma distribuição

normal ($p > 0,05$). A falta de ajuste, que mede o ajuste dos dados ao modelo, foi significativa ($p=0,009$), porém como o erro experimental foi baixo ($<0,001$) e, portanto, a falta de ajuste foi desconsiderada. De acordo com o gráfico da superfície de resposta do tempo e porcentagem de acetonitrila (Figura 13A), a máxima resposta para % ACN foi obtida no ponto central em 42%. Sendo estabelecida a utilização de acetonitrila em 40% uma vez que não houve diferença utilizando as duas concentrações de ACN e tornou mais prático o preparo da solução extratora durante a rotina de análises. Não foi possível trabalhar com 20% de ACN pois formou-se espuma durante o processo de extração e vazamentos no equipamento de extração. Para garantir uma precipitação proteica adequada, todos os extratos foram deixados no freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min logo após a extração no EDGE e em seguida foram centrifugados.

Figura 13. Superfícies de resposta do planejamento Box-Behnken para otimização da porcentagem de acetonitrila, tempo e temperatura. As respostas foram obtidas através das razões de área de sulfito e padrão interno malonato.



Fonte: Elaborado pela autora

As melhores respostas foram obtidas com 10 min de extração, porém valores próximos do máximo ainda foram encontrados com 5 min de extração. A redução do tempo pelo aumento a frequência analítica sem comprometer a eficiência da extração. Portanto, definiu-se o tempo das extrações em 5 min. As respostas obtidas para a variação da temperatura nos gráficos de superfície de resposta (Figuras 13) indicam que a melhor temperatura de extração foi próxima do nível central dos experimentos, 96 °C. As condições otimizadas para a extração de sulfito em camarão por PLE no sistema EDGE foram definidas em 3,0 g de terra diatomácea, 40% de ACN, 5 min de extração à 96°C.

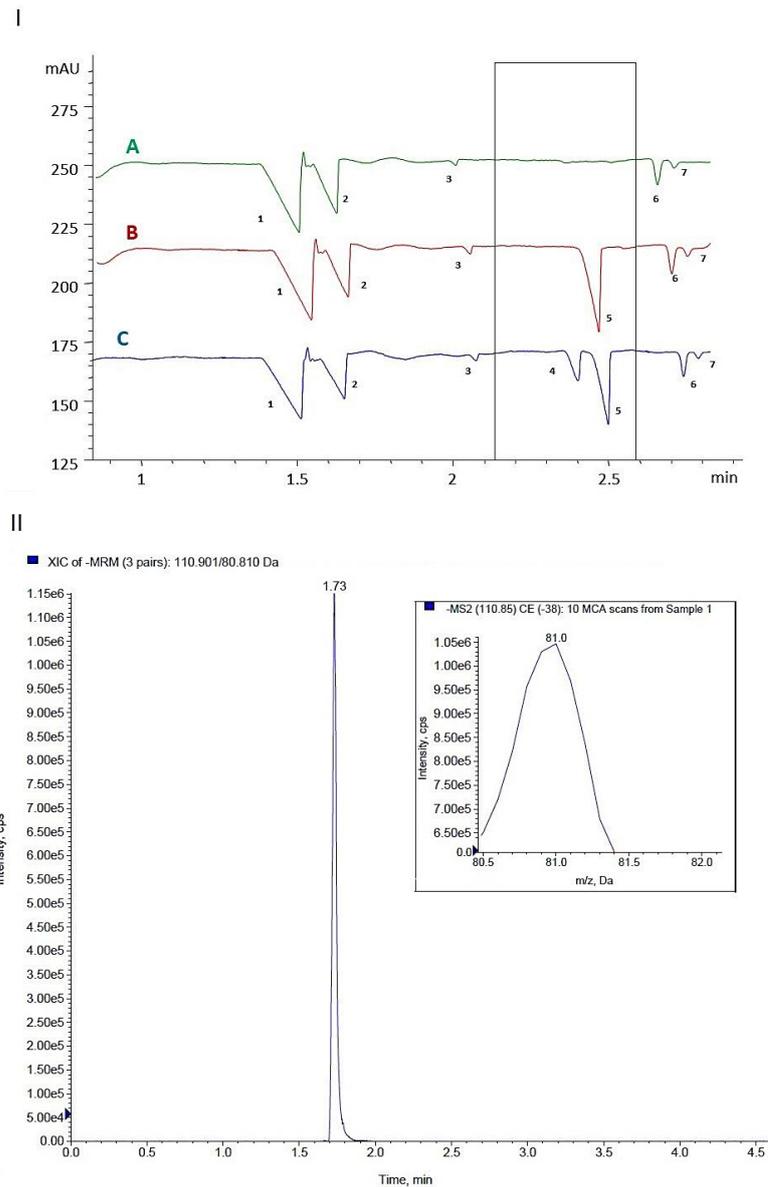
2.3.4. Validação

2.3.4.1. Seletividade

A seletividade do método utilizando a extração sólido-líquido foi comprovada pela ausência dos sinais interferentes como cloreto, sulfato e fosfato em torno dos tempos de migração do analito e do PI (Figura 14 I). Além disso, foi observada concordância de resultados entre o método proposto por CZE-DAD e o método LC-MS/MS para amostras com e sem a presença de sulfito derivatizado (HMS) (Figura 14 II). O íon precursor $m/z -110,9 [M-H]^-$ do HMS foi abundante nos extratos quantificados por CZE-DAD e foi também detectado os fragmentos $m/z -80,8$, que corresponde ao íon sulfito após a fragmentação do HMS e o íon $m/z 30,1$ correspondeu à cadeia carbônica do formaldeído que foi adicionada ao sulfito na reação de derivatização. Os mesmos íons precursores e fragmentos foram usados com condições cromatográficas HILIC por Robbins e colaboradores (2015). Nossos resultados de LC-MS/MS concordaram com esses autores, destacando o uso dessa ferramenta útil para confirmar a identidade do analito e monitorar a reação de derivatização.

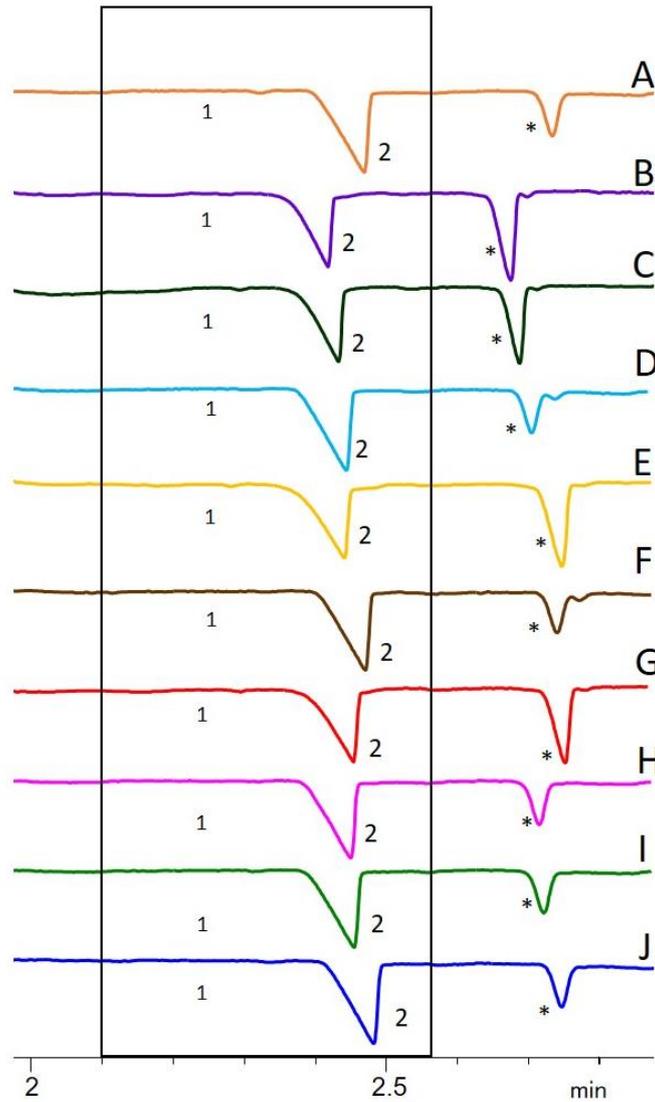
A seletividade do método usando a extração PLE automatizada foi avaliada pela análise de dez amostras brancas diferentes de camarão fortificadas somente com o P.I, onde não foi observado nenhum sinal interferente na região do tempo de migração do HMS (Figura 15).

Figura 14. Avaliação da seletividade. Parte I: (A) amostra em branco de camarão; (B) amostra branca de camarão fortificada com padrão interno (malonato) 50 mg kg^{-1} e (C) amostra branca de camarão fortificada com padrão interno (malonato) a 50 mg kg^{-1} e HMS a 100 mg kg^{-1} . (1) cloreto, (2) sulfato, (3) espécies desconhecidas, (4) sulfito derivatizado, (5) padrão interno (malonato) e (6 e 7) espécies desconhecidas. Parte II: resultados da análise LC-MS/MS de amostra contendo HMS (íon precursor: $m/z -110,9$; fragmento: $m/z -80,8$).



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 15. Amostras brancas de camarão (A –J), sem a presença do HMS na região 1, fortificadas com padrão interno malonato (2) em 40 mg kg^{-1} .



Fonte: Elaborado pela autora

2.3.4.2. Efeito de matriz e linearidade

As razões entre as inclinações para dos três tipos de curvas estudadas demonstrou que houve efeito de matriz para ambos os processos de extração. A avaliação foi realizada por meio da razão do coeficiente angular obtido das curvas de calibração de matriz fortificada e da curva

em solvente. As razões dos coeficientes angulares foram de 1,40 e 1,7 para as curvas comparadas a partir do processo de extração sólido-líquido e PLE automatizada respectivamente. Sendo assim, a calibração e todos os experimentos de validação foram realizados por fortificação de matriz.

Todas as curvas apresentaram coeficiente de determinação (R^2) maiores ou iguais a 0,99. Os gráficos de resíduos não apresentaram nenhum valor discrepante e nenhuma tendência. O ajuste ao modelo linear foi confirmado para as curvas preparadas para os dois processos de extração através do teste F, que demonstrou que os valores de $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o valor do F_{tabelado} , como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de F para verificação da a significância das regressões lineares através do teste F das curvas de calibração preparadas em matriz branca para sulfito com extração sólido-líquido e PLE automatizada.

Extração	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}} (1;16)$
Sólido-líquido	921,84	4,49
PLE automatizada	731,03	4,49

n = 18

2.3.4.3. Precisão e exatidão

As precisões e as exatidões em termos de recuperação foram medidas para os dois processos de extração estudados e seus valores estão compilados na tabela 6.

Tabela 6. Valores de precisão e recuperação, avaliado em três níveis de concentração, em três dias diferentes e com dois analistas diferentes

Parâmetros - Extração sólido-líquido	Nível de fortificação		
	50 mg kg ⁻¹	100 mg kg ⁻¹	150 mg kg ⁻¹
Precisão (CV,%) - Repetibilidade ^a	5,1	3,1	3,4
Precisão (CV%) - Precisão intermediária ^b	5,5	3,9	3,8
Recuperação (%) ^b	99,2 ± 2,9	100,8 ± 2,7	103,1 ± 2,2

Parâmetros – PLE automatizada	Nível de fortificação		
	50 mg kg ⁻¹	100 mg kg ⁻¹	150 mg kg ⁻¹
Precisão (CV,%) – Repetibilidade ^a	2.9	2.8	2.7
Precisão (CV%) - Precisão intermediária ^b	3.2	2.9	3.8
Recuperação (%) ^b	99,0 ± 1,7	96,9 ± 1,3	98,1 ± 2,9

^a (n = 7); ^b (n = 21)

Os valores de CV obtidos nos ensaios de precisão foram satisfatórios para os dois métodos propostos. Valores $\leq 5,1\%$ para repetibilidade e $\leq 5,5\%$ para precisão intermediária indicam que os dois métodos foram precisos para o nível de concentração estudados. A AOAC considera adequados CV de até 11% (AOAC, 2016). Dentre os dois métodos de extração propostos, o PLE automatizado foi o que obteve menores valores de CV. Uma maior precisão era esperada pois, consiste em uma técnica onde quase todo o processo de extração é automatizado, diminuindo os erros relacionados a precisão humana. A precisão também foi considerada satisfatória quando comparada ao método LC-MS/MS desenvolvido por Robbins e colaboradores (2015) para análise de sulfito em camarão cru, que alcançou CV de 11%. Esses autores também compararam seu método com o MW clássico, cujo CV era 28%. As recuperações do CZE-DAD ficaram entre 96,9 e 103,1 % e atenderam aos critérios exigidos pelo INMETRO de 90 a 107% e pela AOAC de 80 a 110%. A recuperação deste método por CZE-DAD foi maior do que a recuperação mínima de 80% estabelecida pelo método volumétrico oficial da AOAC no método de Monier Williams. A derivatização proporcionou estabilidade do analito que melhorou a recuperação em comparação ao método CZE-DAD sem derivatização, cujas taxas de recuperação ficaram entre 81 e 84% (GONÇALVES et al., 2020).

2.3.4.4. Limites de detecção e quantificação

Os limites obtidos para extração por PLE automatizado e pela extração sólido-líquido foram próximos. Os valores de 4,40 e 14,6 mg kg⁻¹ para limites de detecção e quantificação, respectivamente, foram obtidos para a extração sólido-líquido e de 4,6 e 15,4 mg kg⁻¹ para limites de detecção e quantificação, respectivamente, foram obtidos para PLE automatizada. Esses valores demonstram que a sensibilidade adequada foi alcançada pelo método. A exatidão e a precisão no nível de concentração do limite de quantificação foram avaliadas. A precisão apresentou um coeficiente de variação (CV) de 5% (n=7) e a exatidão foi de 105% (n=7)

Há uma grande variação nos métodos de cálculo dos limites analíticos, a comparação dos valores estabelecidos pela relação sinal/ruído com a literatura disponível é uma tarefa bastante difícil. Os limites de quantificação para SO₂ foram definidos pela função linear de calibração (IAMMARINO; DI TARANTO; IENTILE, 2014a) ou pelo desvio padrão de amostras em branco (Robbins et al., 2015), levando a valores como 0,72 mg kg⁻¹ e 8,2 mg kg⁻¹, respectivamente. Os limites de quantificação foram estabelecidos considerando que a adição de pequenas quantidades de sulfito não faz sentido tecnológico e/ou econômico para o processamento de frutos do mar. O método foi projetado para abranger faixas lineares usuais de sulfito em amostras submetidas à rotina analítica, cujos resultados são esperados em torno dos limites regulamentares.

2.3.4.5. Incerteza

As incertezas de medição obtidas foram de 10% para a extração sólido líquido e de 12% para a PLE automatizada. Os principais fatores de contribuição para a incerteza padrão expandida (k = 2,15, distribuição t-Student = 95,45%) foram os erros relacionados a curva analítica, o processo volumétrico e a variabilidade aleatória calculada pela análise de variância dos dados de precisão. Outras fontes de incerteza, como bias (precisão interna) e pesagem da amostra, tiveram influência insignificante na incerteza geral da faixa de medição estimada. A incerteza relativa geral foi menor do que a incerteza relativa do método MW (16%). Este era informação já esperada, pois sabe-se que a recuperação do método titrimétrico é menor, tornando-o uma grande fonte de incerteza (viés). O método MW requer longo tempo de análise,

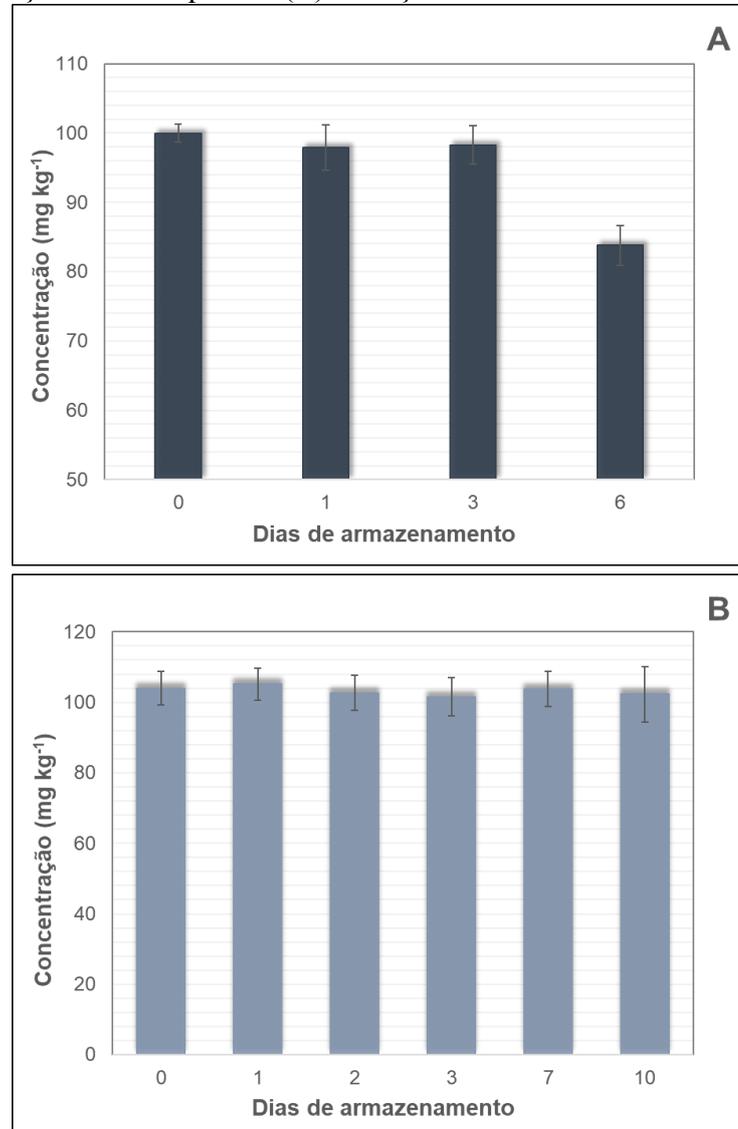
restringindo o número de medições e rendimento analítico. Como geralmente está relacionado à acuidade visual do analista para realizar leituras em buretas, a variabilidade aleatória de MW aumenta, fazendo com que sua incerteza relativa seja maior.

2.3.4.6. *Estabilidade*

Para o método utilizando a extração sólido líquido os extratos permaneceram estáveis por três dias sob refrigeração (Figura 16A). Porém, a partir do terceiro dia, observou-se diferença significativa na concentração média em relação à referência ($p < 0,05$). Os extratos obtidos pela extração PLE automatizada permaneceram estáveis até o décimo dia de armazenamento e nenhuma mudança significativa da sua concentração foi observada ($p > 0,05$) (Figura 16B). O aumento de mais 7 dias de estabilidade ao extrato pode ser devido a melhora na limpeza durante a extração com o EDGE[®] o que é útil em laboratórios com grandes números de amostras na rotina.

Portanto, se o processo analítico precisar ser interrompido devido a algum problema técnico, a reanálise é possível em até três dias para os extratos obtidos por extração sólido-líquido e dez dias para as amostras extraídas por PLE automatizado. A estabilidade proporcionada pela derivatização foi a responsável por essa funcionalidade, pois, sem derivatização o sulfito permanece estável por menos de três horas, prejudicando a reanálise (GONÇALVES et al., 2020).

Figura 16. Gráficos da estabilidade dos extratos contendo 100 mg kg^{-1} de sulfito para: (A) extração sólido líquido e (B) extração PLE automatizada



Fonte: Elaborado pela autora

2.4. APLICAÇÃO DO MÉTODO

Onze dentre as doze amostras não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre PLE automatizado e extração sólido-líquido pela quantificação por CZE-DAD (Tabela 7). A amostra 5 apresentou diferença entre as extrações ($p = 0,007$). Porém, o resultado obtido pelo método Monier Williams para a mesma amostra foi próximo ao valor médio das duas extrações. Além da variação decorrente do processo analítico, variações de concentrações em amostras de camarão já vêm sendo observadas em outros trabalhos (IAMMARINO; DI TARANTO; IENTILE, 2014b; ROBBINS et al., 2015) e podem ocorrer devido aos diferentes processos de aplicação de sulfito em camarões tornando o valor residual variável.

Tabela 7. Concentração de sulfito como SO_2 em amostras de camarão pelo método de CZE-DAD com extrações sólido-líquido e PLE automatizado e pelo método Monier Williams

Samples	SO_2 (mg kg ⁻¹)		
	SLE – CZE-DAD	PLE - CZE-DAD	Monier Williams
1	16.22 ± 0.60	18.05 ± 1.37	-
2	16.77 ± 0.74	17.28 ± 0.32	-
3	20.14 ± 2.20	23.97 ± 2.18	-
4	ND	ND	-
5	48.88 ± 1.20	64.75 ± 2.32	55.67 ± 8.08
6	24.78 ± 0.58	22.77 ± 1.66	20.50 ± 2.12
7	43.51 ± 1.21	43.37 ± 2.15	42.00 ± 3.00
8	80.71 ± 1.57	79.67 ± 2.55	130.00 ± 6.00
9	80.85 ± 3.44	78.17 ± 1.12	106.67 ± 10.21
10	165.92 ± 1,07	153.87 ± 5.56	240.00 ± 16.82
11	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND

n = 3

Quando comparadas as amostras analisadas por CZE-DAD com ambas as extrações e pelo método de Monier Williams verificou-se que não houve diferença significativa entre as análises quando as concentrações de sulfito foram inferiores a 80 mg kg⁻¹ de SO_2 , porém para concentrações acima dessa tem-se uma diferença entre os valores, que é acentuada quanto maior a concentração de sulfito. Essa mesma tendência foi observada por (ROBBINS et al., 2015)

utilizando um método por LC-MS/MS em amostras de frutas secas e cristalizadas, onde o método volumétrico Monier Williams tende a fornecer valores superiores de sulfito quando esse está presente em altas concentrações.

A grande quantidade de agentes sulfitantes (dióxido de enxofre, metabissulfitos, sulfitos e bissulfitos) que podem ser adicionados diretamente em matrizes complexas como pescado acabam resultando em resultados divergentes como os observados, uma vez que diferentes espécies podem ser geradas e as técnicas utilizadas possuem princípios distintos. A técnica de CZE-DAD e LC-MS/MS são específicas para o íon sulfito, enquanto a volumetria pelo Monier-Williams é menos específica, e o analito passa por processos de oxirredução até a formação de ácido sulfúrico que é titulado e relacionado com a concentração em SO_2 .

2.5. ECO-ESCALA

Para avaliar a adequação dos métodos propostos em relação aos princípios da química verde foram calculados os valores para a eco-escala de cada procedimento (Tabelas 7 e 8). O método CZE com extração sólido líquido foi considerado excelente para química verde, pois o valor da eco-escala foi de 76, e o método CZE com extração PLE-automatizada foi considerado adequado para a química verde por ter obtido um valor de eco-escala de 66, a diminuição no valor ocorreu devido ao aumento do volume das soluções usadas nesse sistema de extração.

Os componentes da solução extratora, acetonitrila e formaldeído, são os maiores contribuintes das penalizações pois são reagentes tóxicos de alto risco. Além disso, esses reagentes geram resíduos difíceis de serem tratados. Os reagentes que não possuíam risco à saúde e ao meio ambiente não foram adicionados nas tabelas, uma vez que não geraram penalidades. O consumo de energia pelos equipamentos utilizados foi menor que 0,1 kW/h e não receberam penalizações.

Tabela 8. Eco-escala para o método de determinação de sulfito por CZE com extração sólido-líquido

Reagente	Quantidade	Pictogramas	Risco	Penalização
Acetonitrila	1	2	2	4
Formaldeído	1	3	2	6
Ácido benzenossulfônico	1	2	2	4
Hidróxido de sódio (1 mol L ⁻¹)	1	1	1	1
Resíduos	Quantidade 3		Risco 3	Penalização 9
Risco ocupacional		Risco 0		0
Consumo de Energia	Quantidade			Penalização
CE	≤ 0,1 kWh por amostra			0
Banho-Maria	≤ 0,1 kWh por amostra			0
Ultrassom	≤ 0,1 kWh por amostra			0
Somatório dos pontos			TOTAL	24
			ECO-ESCALA	76

Tabela 9. Eco-escala para o método de determinação de sulfito por CZE com PLE automatizado

Reagente	Quantidade	Pictogramas	Risco	Penalização
Acetonitrila	2	2	2	8
Formaldeído	1	3	2	6
Ác. benzenossulfônico	1	2	2	4
Hidróxido de sódio (1 mol L ⁻¹)	1	1	1	1
Resíduos	Quantidade 5		Risco 3	Penalização 15
Risco ocupacional		Risco 0		0
Consumo de Energia	Quantidade			Penalização
CE	≤ 0,1 kWh por amostra			0
EDGE	≤ 0,1 kWh por amostra			0
Somatório dos pontos			TOTAL	34
			ECO-ESCALA	66

O método AOAC Monier Williams apresenta um total de 34 penalidades, somando um valor de eco-escala de 66 (Tabela 10), o mesmo valor obtido pelo método CZE com extração PLE automatizada. As principais razões para as penalidades no método Monier Williams são o elevado volume de ácido clorídrico utilizado e a considerável geração de resíduos decorrente desse procedimento. Com um valor de eco-escala de 66, o método é classificado como

adequado com os princípios da química verde. Contudo, o cálculo da eco-escala não abrange a grande quantidade de amostra utilizada. No método AOAC, são empregados 50 g de amostra, ao passo que nas abordagens alternativas apresentadas apenas 5 g são necessários. A redução na quantidade de amostra está em conformidade com os fundamentos da química verde.

Tabela 10. Eco-escala para o método de determinação de sulfito pelo método de Monier-Williams

Reagente	Quantidade	Pictogramas	Risco	Penalização
Ácido clorídrico	2	2	2	8
Peróxido de hidrogênio	1	2	2	4
Hidróxido de sódio (0,1 mol L ⁻¹)	1	1	1	1
Nitrogênio	1	1	1	1
Resíduos	Quantidade 5		Risco 3	Penalização 15
Risco ocupacional – Emissão de gases no ar		Risco 3		Penalização 3
Consumo de Energia	Quantidade			Penalização
Titulação	≤ 0,1 kWh por amostra			0
Chapa de aquecimento (>2h)	> 1,5 kWh por amostra			2
Somatório dos pontos			TOTAL	34
			ECO-ESCALA	66

2.6. CONCLUSÕES

O método CZE-DAD otimizado destaca-se como uma abordagem eficaz e veloz para analisar sulfitos, especialmente devido à sua simplicidade de extração e rápida separação por eletroforese. As otimizações baseadas na abordagem de Gonçalves et al. (2020) revelaram-se apropriadas para a análise de sulfito na forma de HMS. A derivatização do sulfito com formaldeído a uma concentração de 0,3% demonstrou a máxima eficácia analítica com diferentes combinações de matriz e/ou concentração de sulfito. Comparado a métodos convencionais, a técnica mostrou um tempo de separação reduzido. Duas metodologias de extração, sólido-líquido e PLE automatizado, foram introduzidas e ambas aderiram aos princípios da química verde. Esse foi o primeiro relato na literatura da utilização de PLE utilizando o sistema EDGE[®] para extração e derivatização simultânea do sulfito com formaldeído em camarões. A validação do método atendeu às diretrizes do INMETRO e AOAC, e a aplicação em amostras de camarões confirmou a eficácia das extrações EDGE[®] e sólido-líquido. Comparado ao método oficial Monier-Williams, o método PLE-CZE-DAD demonstrou concordância em concentrações baixas, porém o método oficial tendeu a retornar resultados mais altos em concentrações elevadas de sulfito. Esse método foi oficialmente reconhecido pelo MAPA em 2022 como o padrão para determinação de sulfitos em pescado, listado no Manual de Métodos Oficiais para análise de produtos de origem animal.

CAPÍTULO 3 - DETERMINAÇÃO DE POLIFOSFATOS EM PESCADO E PRODUTOS CÁRNEOS POR ELETROFORESE CAPILAR EMPREGANDO CAPILAR MODIFICADO COM SAL DE QUITOSANA QUATERNIZADA

3.1. INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO

3.1.1. Fosfatos

O fosfato é um sal do ácido fosfórico, também chamado de ortofosfato (PO_4^{3-}). Quando várias unidades de ortofosfato se ligam, formam uma estrutura mais complexa conhecida como fosfatos condensados ou polifosfatos. O termo "fosfatos" refere-se às espécies formadas por ortofosfato e fosfatos condensados. Não há consenso na literatura quanto à classificação e nomenclatura dessas espécies, mas a classificação mais utilizada divide os fosfatos em quatro grupos: ortofosfato ou monofosfato (1 grupo fosfato); pirofosfato ou difosfato (2 grupos fosfato); trifosfato ou tripolifosfato (3 grupos fosfato) e polifosfatos (4 ou mais grupos de fosfato). Apesar de o pirofosfato ser a menor cadeia formada por fosfatos condensados, alguns autores classificam essa espécie e o trifosfato como polifosfatos, pois apresentam mais de um grupo ortofosfato em sua estrutura (ELLINGER, 2017).

Fosfatos são amplamente utilizados como aditivo alimentar na categoria de estabilizantes em inúmeros tipos de produtos, como pescado, carnes, frangos, pães, laticínios, bebidas e outros. Em produtos cárneos e pescado as principais funções desses aditivos são retenção da umidade, por meio da inibição da perda de líquidos durante a distribuição e comercialização; emulsificação (principalmente de produtos como salsichas); inibição da rancidez oxidativa por meio de quelação de íon metálicos; estabilização da cor e sabor e efeito de crioproteção que reduz os danos de queimaduras por congelamento (BJØRKEVOLL; REBOREDO; FOSSEN, 2017; ELLINGER, 2017; GONCALVES; RIBEIRO, 2008).

A ANVISA por meio da IN n° 211 de 2023 n° 329 estabelece quais fosfatos podem ser empregados como aditivos em pescado, carnes e produtos cárneos (Tabela 11).

Tabela 11. Principais fosfatos permitidos como aditivo em carnes, produtos cárneos e pescado de acordo com a ANVISA

Fosfato	INS*
Ácido fosfórico, ácido ortofosfórico	338
Fosfato de sódio monobásico; Fosfato dissódico; Fosfato trissódico	339i; 339ii; 339iii
Fosfato de potássio monobásico; Fosfato de potássio dibásico	340i; 340ii; 340iii
Fosfato monobásico de cálcio; Fosfato de cálcio dibásico; Fosfato tribásico de cálcio	341i; 341ii; 341iii
Pirofosfato dissódico; Pirofosfato trissódico; Pirofosfato tetrassódico	450i; 450ii; 450iii
Pirofosfato de potássio; Pirofosfato de cálcio; Pirofosfato monobásico	450v; 450vi; 450vii
Tripolifosfato de sódio; Tripolifosfato de potássio	451i; 451ii
Hexametafosfato de sódio; polimetafosfato de potássio; Polifosfato de cálcio e sódio	452i; 452ii; 452iii

*INS – *International Numbering System* (Sistema Internacional de Numeração)

Fonte: Adaptado da RDC n° 329/2019 e RDC n° 272/2019

Quando utilizado da maneira correta os fosfatos possibilitam a entrega de um produto de boa qualidade com a maciez e suculência adequada. Entretanto, quando utilizado em excesso e de maneira inadequada ocorre uma absorção excessiva de água levando a uma adulteração caracterizada como fraude econômica, podendo inclusive mascarar produtos com má qualidade e deteriorados (GONÇALVES; SOUZA; REGIS, 2018; GUIMARÃES et al., 2016). Além disso, a exposição excessiva do ser humano ao fosfato pode causar problemas de saúde como descalcificação, calcificação vascular, disfunção renal, redução da fertilidade, entre outros (BROWN; RAZZAQUE, 2016; RITZ et al., 2012; STEVENS, 2014).

Para evitar o uso excessivo desses aditivos, a legislação brasileira estipula um limite máximo de fosfatos residuais de 5 g kg^{-1} (0,5%), expresso como P_2O_5 , em pescados, carnes e produtos cárneos. E nos pescados o uso é permitido apenas na etapa de congelamento.

3.1.2. Métodos para a determinação de fosfatos

O Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) estabelece os métodos físico-químicos oficiais para o controle do fosfato no pescado. Para a determinação desse aditivo emprega-se um método fundamentado 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 (BRASIL, 2022). Esse é um método analítico clássico laborioso, no qual para a sua realização é necessária uma grande quantidade de vidrarias e de reagentes que são tóxicos e corrosivos, gerando um grande risco para o analista e para o meio ambiente, uma vez que grandes quantidades de resíduos são geradas através desse método. Outra característica desse método é a impossibilidade de analisar as espécies de fosfato individualmente, pois todo o fósforo da amostra é convertido em ortofosfato. A falta de seletividade desse método impede a identificação do tipo de aditivo de fosfato usado no pescado. Como diferentes espécies de fosfato podem ser empregadas, é interessante a aplicação de um método que permita analisar essas espécies, principalmente as que são mais utilizadas na produção de pescado e cárneos (ortofosfato, pirofosfato e tripolifosfato), pois cada uma delas possui diferentes capacidades de retenção de água e estabilidade afetando de maneira diferencial as características do produto (LEE et al., 2018).

Para a verificação desses aditivos o MAPA utiliza um segundo método a fim de identificar os principais tipos de fosfatos utilizados em pescado, que são tripolifosfato, pirofosfato, trimetafosfato e ortofosfato. Esse método é feito por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC - do inglês, *high performance liquid chromatography*) empregando mecanismo de separação por troca iônica, com um módulo de derivatização pós coluna e com detector na faixa UV-Vis (BRASIL, 2022; YOZA et al., 1991). Este é um método que envolve uma série de reagentes e materiais específicos, e com tempos de separação relativamente longos, acima de 40 minutos. Além disso, o método é usado apenas de forma qualitativa e não possibilita determinar a concentração de cada uma das espécies de fosfatos no pescado e atrelar esses teores a limites máximos permitidos que futuramente poderiam ser estabelecidos por órgãos reguladores. A legislação brasileira não recomenda nenhum método que seja quantitativo e que permita determinar as concentrações das espécies de fosfatos individualmente e devido as características intrínsecas desses aditivos esse monitoramento seria um aprimoramento importante do método para análise de fosfatos em pescados.

Além desses métodos são encontrados na literatura (Tabela 12) outros métodos espectrofotométricos com conversão total do fósforo, métodos por HPLC com mecanismo de

troca iônica, derivatização pós coluna e detecção UV-Vis, HPLC em fase reversa com detecção UV-Vis, métodos por cromatografia iônica com a utilização de detectores de condutividade ou módulo de derivatização pós coluna e com detecção UV-Vis. São reportados também métodos com multi-analitos incluindo fosfatos por HPLC acoplado com espectrometria de massas sequencial (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) (KAUFMANN et al., 2018) e métodos utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear de fósforo³¹ (HRYNCZYSZYN; JASTRZEBSKA; SZŁYK, 2010; MISSONG et al., 2016; RULLIERE et al., 2013).

Os métodos por eletroforese mais recorrentes na literatura utilizam o modo de Isotacoforese Capilar com detectores de condutividade. Um modo de CE que também pode ser utilizado para análise de espécies de fosfato, mas que ainda é pouco explorado para a determinação de fosfatos em alimentos é o modo de Eletroforese capilar de Zona (CZE, do inglês, *Capillary Zone Electrophoresis*) com detecção por UV-vis indireta, um sistema de detecção simples, relativamente sensível e acessível a todos os equipamentos de CE potencializando sua aplicabilidade em análises de rotina. A maioria dos métodos por CZE para a determinação de fosfatos são aplicados em matrizes como detergentes ou soluções aquosas. O único método relatado com CZE com detecção indireta em pescado foi reportado por Wang e colaboradores (WANG; LI; ZHANG, 2015).

Nos métodos de análise de fosfatos em alimentos, é importante ter um cuidado especial devido à presença da enzima fosfatase, que catalisa a conversão natural de polifosfatos em ortofosfato por meio da reação de hidrólise. Para garantir boa precisão na determinação de polifosfatos é necessário aplicar algum método de inibição da reação de hidrólise antes da análise (MOLINS; KRAFT; OLSON, 1985; WANG; LI; ZHANG, 2015). Na literatura nem todos os métodos para a determinação de fosfatos apresentam alguma forma de inativar a fosfatase, o que não é o recomendado, pois a conversão dos polifosfatos em ortofosfato irá gerar uma falsa resposta a respeito das concentrações das espécies de fosfato. Dentre as técnicas mais recorrentes para o controle da hidrólise de fosfato usam as altas temperaturas no processo de cocção da amostra para inativar a fosfatase, o controle do pH na solução de extração, uso de ácido tricloroacético (TCA), micro-ondas e pré-tratamento de alta pressão (DAFFLON et al., 2003; KAUFMANN et al., 2018; VAN NGUYEN et al., 2012; WANG; LI; ZHANG, 2015).

A extração sólido-líquido é o tipo de extração mais empregado nos trabalhos de determinação de fosfatos em pescado. É recorrente o uso de soluções de TCA na extração pelo

fato dele também auxiliar na inativação da enzima fosfatase, essa extração costuma ser feita por agitação e ultrassom, e a separação do extrato costuma ser feito por centrifugação e filtração. Por serem aditivos alimentares os limites estipulados na legislação são relativamente altos, logo não é necessário um método altamente sensível, e o preparo da amostra pode ser simplificado sem o uso de métodos de pré-concentração, apenas um *clean-up* do extrato para retirada da matriz complexa de pescado.

Tabela 12. Métodos encontrados na literatura para determinação de fosfatos com as formas de inativação da fosfatase

Técnica	Analitos	LD / LQ	Exatidão (%)	Amostra / Preparo da Amostra	Inativação da Fosfatase	Referência
LC - MS	Ortofosfato, Pirofosfato, Tripolifosfato e outros 16 aditivos	[n.i] / 3 - 30 (mg kg ⁻¹)	15 - 234	Camarão e salame / Amostras foram homogeneizadas com EDTA, aquecidas em banho de água fervendo por 20 min e analisadas.	Tratamento térmico com banho de água fervente	KAUFMANN et al., 2018
IC- UV-Vis (Derivatização pós coluna)	Ortofosfato, Pirofosfato, Tripolifosfato e Trimetafosfato	[n.i]	[n.i]	Materiais de fabricação de detergentes / Amostras foram dissolvidas em KCl 0,1 mol L ⁻¹ e analisadas.	[n.i]	LINARES; DE CASTRO; VALCARCEL, 1991
IC- UV-Vis (Derivatização pós coluna)	Ortofosfato, Pirofosfato e Tripolifosfato	500 / [n.i] (mg kg ⁻¹)	88 - 106	Camarões / Amostras trituradas, agitadas com água por 30 min, centrifugadas e filtradas. Os extratos passaram por cartuchos de SPE com C18 e então as analisados.	[n.i]	HEITKEMPER et al., 1993
IC-CD	Ortofosfato, Pirofosfato, Tripolifosfato e Hexametafosfato	0,1 - 0,4 / [n.i] (µmol L ⁻¹)	99 - 111	Bacalhau e Camarão / Amostra congelada foi homogeneizada com TCA, ajustada o pH com NaOH até pH>8, colocada em ultrassom por 8 min, centrifugada e analisada.	Adição de TCA e ajuste de pH	GAO; YUAN; YU, 2012
IC-CD	Ortofosfato Pirofosfato Tripolifosfato Tetrapolifosfato	0,1 - 0,5 / [n.i] (µmol L ⁻¹)	[n.i]	Presunto, peixe em pasta e queijo / Amostras foram homogeneizadas com TCA 4%, centrifugadas por 10 min, diluídas e filtradas.	Adição de TCA	SEKIGUCHI et al., 2000

Técnica	Analitos	LD / LQ	Exatidão (%)	Amostra / Preparo da Amostra	Inativação da Fosfatase	Referência
IC-CD	Ortofosfato Pirofosfato, Tripolifosfato Trimetafosfato	[n.i]	[n.i]	Bacalhau / A amostra foi triturada, agitada com água por 1 min, colocada no ultrassom por 10 min, centrifugada, adicionado TCA no sobrenadante e centrifugada novamente por 15 min. Ajustou-se o pH e a solução foi filtrada e analisada.	Adição de TCA e ajuste de pH	VAN NGUYEN et al., 2012
IC-CD	Pirofosfato Tripolifosfato Trimetafosfato Tetrapolifosfato	8 - 33 / 24 - 99 (mg kg ⁻¹)	87 - 101	Presunto cozido, salsicha, carne enlatada, queijo processado, surimi, peixes e camarões / Amostras homogeneizadas com água, agitadas por 1 min e centrifugadas por 5 min. O sobrenadante foi filtrado e analisado.	[n.i]	IAMMARINO; DI TARANTO, 2012
IC-CD	Tripolifosfato	5,0 / [n.i] (mg Kg ⁻¹)	88 - 105	Vieira e bacalhau / As amostras foram trituradas e a extração foi realizada com água no ultrassom por 10 min, depois foram filtradas e diluídas com 5 ml de TCA. Amostras foram filtradas e então utilizado o NaOH par ajustar o pH>8.	Uso de TCA e ajuste de pH	CUI; CAI; XU, 2000
CITP - CD	Ortofosfato Pirofosfato Tripolifosfato Nitrato e Nitrito	0,4 - 3,0 / 1,5 - 10,8 (mg L ⁻¹)	89 - 117	Carne enlatada, queijo, camarões, lulas e misturas de frutos do mar / Amostras trituradas foram extraídas com água destilada usando um agitador orbital por 30 min. Os extratos foram centrifugados por 30 min, filtrados, diluídos para 50 ml e analisados.	[n.i]	JASTRZEBSKA, 2011

Técnica	Analitos	LD / LQ	Exatidão (%)	Amostra / Preparo da Amostra	Inativação da Fosfatase	Referência
CITP - CD	Ortofosfato, pirofosfato tripolifosfato	0,4 - 1,1 / 1,2 - 3,7 (mg L ⁻¹)	98	Carne de porco / Amostra foi triturada, agitada com NaOH por 60 min, centrifugada por 30 min, filtrada, diluídas e analisadas.	[n.i]	JASTRZEBSKA; HOL; SZŁYK, 2008
CITP - CD	Tripolifosfato	0,8 / 2,7 (mg L ⁻¹)	97 - 98	Carne de porco crua, cozida e defumada / Amostras foram trituradas, extraídas com NaOH com agitação por 30 min, centrifugadas e filtradas. Foi corrigido o pH para 8, e então as amostras foram diluídas e analisadas	Controle do pH no final da extração	JASTRZEBSKA, 2006
CITP - CD	Ortofosfato Pirofosfato Tripolifosfato	0,3 / 1,0 (mg L ⁻¹)	[n.i]	Sabão, fermento, pasta de dente, presunto e peixe / As amostras foram cortadas em pedaços e extraídas em água com banho de ultrassom. As amostras foram diluídas e analisadas	[n.i]	VALENTOVÁ; BARTOŠ; MIKYSEK, 2012
CITP - CD	Ortofosfato Pirofosfato	2,0 / 5,0 (μmol L ⁻¹)	[n.i]	Presunto, salsichas, mortadela, patê, carne de diferentes espécies / As amostras trituradas foram homogeneizadas com água destilada em banho de ultrassom por 30 min, diluídas, filtradas com filtro de membrana 0,45mm e analisadas	[n.i]	DUŠEK et al., 2003

Técnica	Analitos	LD / LQ	Exatidão (%)	Amostra / Preparo da Amostra	Inativação da Fosfatase	Referência
CE - UV Indireto	Ortofosfato Pirofosfato Tripolifosfato	20,0 -50,0/ [n.i] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	91 - 106	Detergentes comerciais / Foi feita apenas diluição da amostra	[n.i]	WANG; LI, 1996
CE - UV Indireto	Ortofosfato Pirofosfato Tripolifosfato	[n.i]	[n.i]	Soluções padrões dos analitos / Foi feita apenas diluição da amostra.	[n.i]	STOVER; KEFFER, 1993
CE - UV Indireto	Ortofosfato Pirofosfato Tripolifosfato	0,23-0,33/ 0,77 -1,00 (mg g^{-1})	79 - 105	Peixe e Camarão / As amostras foram trituradas e extraídas com TCA (4%), colocadas em ultrassom com 40 Hz por 10 min, centrifugadas por 10 min e filtradas. O pH foi ajustado para $\text{pH} > 8$, feita diluição com TCA 4%, e a amostra filtrada e analisada.	Pré-tratamento de alta pressão (HPP) 400MPa/10min	WANG; LI; ZHANG, 2015

LD – Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação
[n.i] – Não informado

3.2. EXPERIMENTAL

3.2.1. Reagentes e soluções

Os padrões analíticos utilizados foram fosfato de sódio (Na_3PO_4), pirofosfato de potássio ($\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$), tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), trimetafosfato trisódico ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$) e ácido malônico, adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Seus estoques individuais de 1000 mg L^{-1} foram preparados em água ultrapura (sistema Milli-Q®, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e armazenados sob refrigeração até o momento do uso. Ácido aminocaprílico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido ftálico, β -alanina, butilamina, Tris(hidroxi metil)aminometano (TRIS), Bis(2-hidroxi etil)aminotris(hidroxi metil)aminometano (BIS-TRIS) provenientes da Sigma Aldrich foram empregados no desenvolvimento do método e na escolha do eletrólito de corrida, suas soluções foram preparadas com água ultrapura no momento da análise nas concentrações descritas na Tabela 13. Hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), ácido clorídrico (Synth, Diadema, SP, Brasil) e acetona da Tédia (Fairfield, OH, EUA) também foram utilizados.

Para modificação das paredes internas dos capilares foi utilizado recobrimento com sal de quitosana quaternizada (SAQQ) 0,2% (m/v) preparada com ácido clorídrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. SAQQ foi sintetizado seguindo os procedimentos de (QIN et al., 2004) e (VITALI et al., 2014) a partir da quitosana com 90% de desacetilação adquirida da Purifarma (São Paulo, SP, Brasil).

3.2.2. Programas utilizados e tratamento de dados

O desenvolvimento e otimização do método por eletroforese foi realizado com auxílio do *software Peakmaster*® versão 5.3, *SIMULSC*® e *Chemicalize*. O tratamento dos dados e as análises estatísticas foi conduzido no *Statistica*® 13.0 e no *Excel*, pacote *Office 365*.

3.2.3. Instrumentação e método analítico

Todas as análises de eletroforéticas foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar da Agilent Technologies modelo 7100 (Palo Alto, CA, USA) equipado com

um detector de arranjo de diodos que abrange de 190 a 600 nm. Os comandos do equipamento assim como a aquisição e tratamento dos dados foram realizados pelo *software ChemStation*[®]. Foram utilizados capilares de sílica fundida revestido de poli-imida da Agilent Technologies e da empresa NST (São Carlos, SP, Brasil) com comprimento total de 48,5 cm, comprimento efetivo até o detector de 40 cm e diâmetro interno de 75 μm . As injeções foram realizadas no modo hidrodinâmico com pressão de 50 mbar por 5 segundos. A tensão aplicada para a separação foi de 20 kV com polaridade negativa na extremidade de injeção e a temperatura foi mantida em 15 °C. A detecção dos analitos foi realizado pelo modo indireto e acompanhado em 220 nm. O eletrólito de corrida otimizado composto por 30 mmol L⁻¹ ácido fumárico e 60 mmol L⁻¹ de ácido amicocapróico, pH = 4,08, foi preparado diariamente em água. As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro modelo 913 da Metrohm (Herisau, Suíça) e no modelo B474 da Micronal (São Paulo, SP, Brasil).

Todos os capilares passaram por um condicionamento inicial com pressão de 940 mbar com hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹ por 30 min e depois água ultrapura por 30 min. Os capilares que foram revestidos com SAQQ passaram pelo condicionamento inicial citado e em seguida foram lavados com a solução 0,2% (m/v) de SAQQ em ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹ por 15 min, foi mantido contato estático por mais 15 min e em seguida foi condicionado com eletrólito de corrida por 15 min. No início de cada dia de análise os capilares revestidos foram lavados somente com 15 min de eletrólito e entre as corridas o capilar foi lavado com eletrólito por 1 min. Quando necessário refazer o revestimento o capilar era novamente lavado com SAQQ 0,2% por 15 min e mantido contato com a solução por mais 15 min.

3.2.4. Medida da estabilidade do capilar revestido com SAQQ

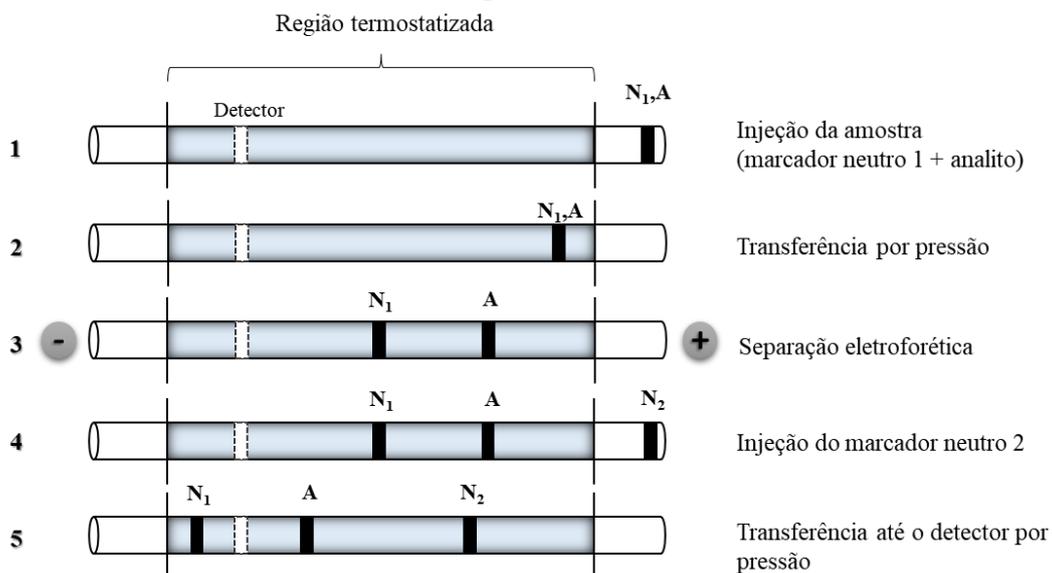
A estabilidade do revestimento com SAQQ foi avaliada por meio de injeções consecutivas de amostras de salsicha e camarão fortificadas com os analitos ortofosfato, pirofosfato, tripolifosfato, trimetafosfato em seis níveis de concentração e o padrão interno ácido malônico. Foram realizadas 80 injeções e a estabilidade foi avaliada pelo coeficiente de variação dos tempos e das razões dos tempos dos analitos para verificar o momento de refazer o revestimento com SAQQ no capilar.

3.2.5. Desenvolvimento do método

3.2.5.1. Determinação das mobilidades pelo método de Williams e Vigh

Para determinar as mobilidades iônicas dos analitos foi utilizado o método desenvolvido por Williams e Vigh por eletroforese capilar e a equação de Onsanger (VISTUBA et al., 2015; WILLIAMS; VIGH, 1996). A execução do método de Williams e Vigh está descrita na Figura 17. Resumidamente, é feita uma sequência de injeções com um marcador neutro (nesse caso foi usado a acetona) e o analito, suas transferências pelo capilar é realizada via aplicação de pressão e voltagem. A determinação da mobilidade iônica dos analitos levou em consideração a relação do tempo entre os analitos e os marcadores neutros, além dos parâmetros utilizados no método como voltagem, tempo de aplicação de voltagem, tamanho do capilar, entre outros.

Figura 17. Etapas do método de Williams e Vigh para determinação da mobilidade dos polifosfatos.



Fonte: Adaptado de Williams; Vigh (1996).

Antes de iniciar as sequências de injeções é realizado o condicionamento do capilar com o eletrólito adequado. Em seguida na etapa 1 é injetado um *plugue* de uma solução do eletrólito contendo o marcador neutro (N_1) e o analito (A), neste caso aniônico. Na sequência, na etapa 2, é feita a transferência da banda N_1,A por pressão ao longo de um tempo até essa banda chegar na região termostaticada do capilar, o que minimiza efeitos da temperatura na

medida das mobilidades. Na etapa 3 é aplicada uma tensão por um determinado tempo para a separação do analito aniônico do marcador neutro. O marcador neutro migra para o cátodo (eletrodo negativo), por ser arrastado pelo fluxo eletrosmótico normal (também chamado de fluxo catódico) com uma mobilidade μ_{eo} , e o analito aniônico migra também para o cátodo, porém com a combinação da sua mobilidade real μ_{act,A^-} e μ_{eo} . Depois dessa etapa a voltagem retorna ao zero, e na etapa 4, um segundo *plugue* é injetado, porém nessa solução não há o analito, somente uma solução do eletrólito com marcador neutro (N_2). Por último, na etapa 5 é realizada uma injeção de eletrólito por pressão até as bandas dos marcadores e do analito chegarem a janela de detecção.

Para determinar as mobilidades dos analitos os seguintes cálculos são empregados:

$$\mu_{act,A^-} = \frac{L_A \times L_T}{V_{apl} \left(t_{migr} - \frac{t_{ramp-up}}{2} - \frac{t_{ramp-down}}{2} \right)} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde, μ_{act,A^-} é a mobilidade real ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$); V_{apl} é a voltagem aplicada (V); t_{migr} é o tempo que o potencial é aplicado (s); $t_{ramp-up}$ é o tempo que o equipamento leva para atingir a voltagem programada e $t_{ramp-down}$ é o tempo para voltar a voltagem a zero; L_{tot} é o comprimento total do capilar (cm) e L_A representa a distância entre o analito aniônico e o marcador N_1 , esse termo pode ser calculado pela equação abaixo:

$$L_A = (t_A - t_{N_1}) V_m \quad (\text{Equação 6})$$

Nessa equação t_A e t_{N_1} são os tempos de migração do ânion e do primeiro marcador neutro (s) respectivamente. V_m é a velocidade de mobilização final por pressão aplicada (cm s^{-1}) e é calculada pela equação:

$$V_m = \frac{L_{det}}{N_2 + \frac{t_{inj}}{2} - t_d} \quad (\text{Equação 7})$$

Na qual L_{det} é o comprimento do capilar até a janela de detecção (cm); N_2 é o tempo do segundo marcador neutro (s); t_{inj} é o tempo de injeção de cada *plugue* (s).

Depois de calculada a μ_{act,A^-} , a mobilidade iônica μ_{0,A^-} ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) foi obtida com a equação de Onsanger abaixo (VISTUBA et al., 2015).

$$\mu_{act,A^-} = \mu_{0,A^-} - [0,23\mu_{0,A^-} + 31,3 \times 10^{-5}] \frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde I é a força iônica do meio, e os valores da equação de 0,23 e $31,3 \times 10^{-5}$ estão relacionados com a permissividade do composto no vácuo e a viscosidade.

A inserção dos analitos no capilar foi realizada por pressão de 50 mbar por 3 s. Em todas as análises foi aplicada uma tensão de 15 kV que variou de 30 a 60 s, os valores de $t_{\text{ramp-up}}$ foram de 6 s e os valores de $t_{\text{ramp-down}}$ foram de 2 s. A pressão utilizada para levar os analitos até o detector foi de 100 mbar. As determinações das mobilidades foram realizadas em capilar de sílica fundida sem revestimento e os experimentos foram feitos em triplicata utilizando soluções padrão dos analitos e simultaneamente foi analisado uma solução padrão de cloreto que possui seu valor de mobilidade conhecida, para verificar se o método estava adequado e calcular os erros experimentais das medidas.

Foram utilizados para esse método dezoito eletrólitos com pH variando de 2,5 a 9,50 e suas composições estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13. Composição e pH dos eletrólitos usados no método de Williams e Vigh para determinação das mobilidades dos analitos

pH	Composição do eletrólito
2,50	Ácido Maleico 20,0 mmol L ⁻¹ e β-alanina 14,0 mmol L ⁻¹
2,75	Ácido Maleico 20,0 mmol L ⁻¹ e β-alanina 18,7 mmol L ⁻¹
3,00	Ácido Maleico 20,0 mmol L ⁻¹ e β-alanina 24,0 mmol L ⁻¹
3,25	Ácido Maleico 20,0 mmol L ⁻¹ e β-alanina 30,0 mmol L ⁻¹
3,50	Ácido Maleico 20,0 mmol L ⁻¹ e β-alanina 40,0 mmol L ⁻¹
3,75	Ácido Maleico 20,0 mmol L ⁻¹ e Ácido aminocapróico 23,7 mmol L ⁻¹
4,00	Ácido Maleico 20,0 mmol L ⁻¹ e Ácido aminocapróico 28,0 mmol L ⁻¹
4,25	Ácido Maleico 20,0 mmol L ⁻¹ e Ácido aminocapróico 33,5 mmol L ⁻¹
4,50	Ácido Maleico 20,0 mmol L ⁻¹ e Ácido aminocapróico 45,0 mmol L ⁻¹
4,75	Ácido Maleico 20,0 mmol L ⁻¹ e Ácido aminocapróico 64,0 mmol L ⁻¹
5,00	Ácido Maleico 20,0 mmol L ⁻¹ e Ácido aminocapróico 100,0 mmol L ⁻¹
5,50	Ácido Maleico 15,0 mmol L ⁻¹ e Ácido aminocapróico 130,0 mmol L ⁻¹
6,00	Ácido Maleico 15,0 mmol L ⁻¹ e BISTRIS 21,8 mmol L ⁻¹
6,50	Ácido Maleico 15,0 mmol L ⁻¹ e BISTRIS 30,0 mmol L ⁻¹
7,00	Ácido Maleico 15,0 mmol L ⁻¹ e BISTRIS 50,0 mmol L ⁻¹
7,50	Ácido Maleico 15,0 mmol L ⁻¹ e BISTRIS 120,0 mmol L ⁻¹
8,00	Ácido Maleico 15,0 mmol L ⁻¹ e TRIS 51,0 mmol L ⁻¹
9,50	Ácido Maleico 15,0 mmol L ⁻¹ e Butilamina 32,5 mmol L ⁻¹

3.2.5.2. Otimização do eletrólito de corrida

Foram construídas as curvas de mobilidade efetiva *versus* pH utilizando o *software* SIMULSC para determinar a faixa de pH para a separação e depois foi utilizado o *software* Peakmaster[®] para otimizar as melhores composições do eletrólito de corrida com base na resolução entre os sinais dos analitos, padrão interno e possíveis interferentes presente em amostras de carnes e pescado, considerando também capacidade tamponante adequada e mínima assimetria dos sinais ocasionados por efeitos de dispersão por eletromigração (EMD, do inglês “*Electromigration Dispersion*”). Quatro eletrólitos foram selecionados para serem testados experimentalmente: Ácido fumárico 20 mmol L⁻¹ e β-alanina 120 mmol L⁻¹ pH = 4,03, ácido ftálico 20 mmol L⁻¹ e ácido aminocapróico 40 mmol L⁻¹ pH = 4,36, ácido maleico 30 mmol L⁻¹ e ácido aminocapróico 60 mmol L⁻¹ pH = 4,36, ácido maleico 20 mmol L⁻¹ e ácido aminocapróico 40 mmol L⁻¹ pH = 4,42 e ácido fumárico 30 mmol L⁻¹ e ácido aminocapróico 60

mmol L⁻¹ pH = 4,08. A mobilidade do fluxo eletrosmótico foi medida experimentalmente e com o auxílio do *Peakmaster*[®] para usar nas simulações.

3.2.5.3. Otimização multivariada da voltagem e temperatura

Os parâmetros temperatura e voltagem foram avaliados por meio de um planejamento fatorial em três níveis (mínimo, ponto central e máximo). Os fatores, os níveis e a matriz do planejamento estudado estão na Tabela 14 abaixo:

Tabela 14. Matriz de experimento com fatores e níveis para otimização dos parâmetros de separação do método de polifosfatos por eletroforese capilar

Ensaio	Fatores e níveis codificados		Fatores e níveis experimentais	
	Temperatura (°C)	Voltagem (kV)	Temperatura (°C)	Voltagem (kV)
1	-1	-1	10	-15
2	-1	0	10	-20
3	-1	+1	10	-25
4	0	-1	15	-15
5	0	0	15	-20
6	0	+1	15	-25
7	+1	-1	20	-15
8	+1	0	20	-20
9	+1	+1	20	-25
10	0	0	15	-20
11	0	0	15	-20
12	0	0	15	-20

A avaliação foi feita por meio de um fator resposta considerando a resolução entre os pares críticos dos analitos e interferentes e o tempo de migração do último analito (Equação 9).

$$Fator\ resposta = \frac{Resolução\ do\ par\ crítico\ (Sulfito\ e\ Pirofosfato)}{Tempo\ de\ migração\ do\ último\ analito} \quad (Equação\ 9)$$

3.2.5.4. Otimização do preparo da amostra

A partir de uma massa de 5 gramas de uma amostra homogeneizada de presunto com inativação da fosfatase por micro-ondas avaliou-se univariadamente os volumes 10, 15, 20 e 25 ml de água para extração considerando diluições posteriores de 5 e 10 vezes. O melhor volume foi determinado com base na área do pirofosfato presente na amostra e no ruído da linha base.

O tempo de agitação e o tempo de ultrassom foram avaliados por um planejamento Doehlert com dois fatores. Para os experimentos foram usadas uma amostra comercial de presunto contendo pirofosfato e ortofosfato. A amostra foi aquecida até 72°C em micro-ondas, triturada e homogeneizada. Foram utilizados 5 g com 15 mL de água, o extrato foi homogeneizado em ultraturrax e a extração foi seguida conforme a Tabela 15 do planejamento Doehlert. A resposta do planejamento foi avaliada pelo somatório das razões de área do pirofosfato presente na amostra.

Tabela 15. Matriz de experimento com fatores e níveis para otimização do tempo de agitação e tempo de ultrassom para extração de polifosfatos por eletroforese capilar

Ensaio	Fatores e níveis codificados		Fatores e níveis experimentais	
	Tempo de Ultrassom	Tempo de Agitação	Tempo de Ultrassom (min)	Tempo de Agitação (min)
1	+1	0	30	15
2	+0,5	+0,866	22,5	30
3	-1	0	0	15
4	-0,5	-0,866	7,5	0
5	+0,5	-0,866	22,5	0
6	-0,5	+0,866	7,5	30
7	0	0	15	15
8	0	0	15	15
9	0	0	15	15

3.2.6. Amostras

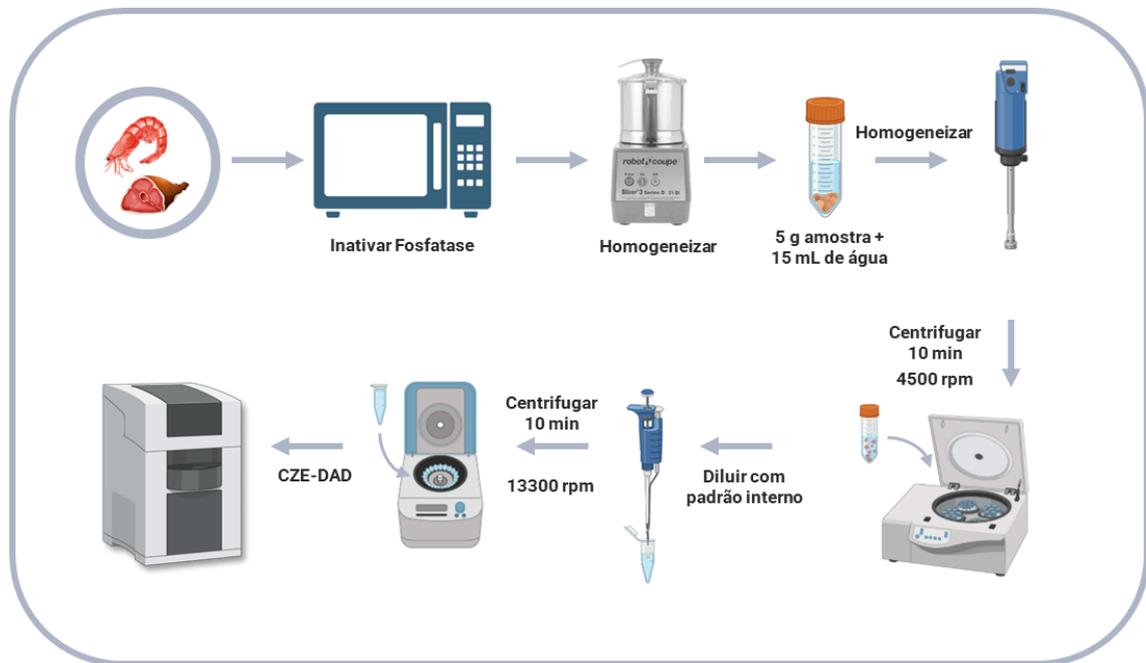
Foram analisadas ao todo cinco amostras, sendo duas amostras de presunto, uma amostra de filé de peixe, uma amostra de camarão e uma amostra de salsicha. Todas as amostras foram adquiridas do comercio local das cidades de Florianópolis e São José no estado de Santa Catarina.

3.2.6.1. Preparo das amostras

Primeiramente a amostra foi colocada em um recipiente de vidro, cortada em pedaços menores quando necessário, e levada a micro-ondas doméstico em potência máxima (modelo Piccolo light 800W – Panasonic, Osaka Japão) de 1 a 2 min, ou até atingir a temperatura de 72°C. A amostra foi então homogeneizada em um homogeneizador modelo Blixer[®]3 (Robot Coupe, Paris, França) e uma alíquota de $5,0 \pm 0,1$ g foi coletada em tubos de fundo cônico de

polipropileno de 50 mL e adicionados 15 mL de água ultrapura. A amostra foi homogeneizada em disruptor de tecidos ultra-turrax (modelo T18, IKA® Staufen, Alemanha) à 25000 rpm e depois levada a centrifugação por 10 min à 4500 rpm à 4°C. O sobrenadante foi coletado diluído adequadamente com padrão interno e esta solução foi agitada em vórtex, centrifugada à 13300 rpm por 5 min à 4 °C em uma centrífuga de microtubos. O sobrenadante foi coletado e reservado para análise (Figura 18). A concentração do padrão interno malonato em todas as amostras foram 70 mg L⁻¹.

Figura 18. Representação esquemática do preparo de amostra para o método de determinação de fosfatos por CZE.



Fonte: Elaborado pela autora

3.2.7. Validação analítica

A validação do método proposto foi realizada de acordo com as orientações do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (BRASIL, 2020) e AOAC (AOAC, 2016) os parâmetros avaliados foram: Seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção e quantificação, precisão e recuperação. A incerteza padrão expandida foi calculada de acordo com a norma ISO 21748 (ISO, 2017).

3.2.7.1. *Seletividade*

Para avaliar a seletividade, foram realizadas simulações das separações dos analitos e interferentes usando o software Peakmaster®. Depois, foram feitos testes experimentais para separar os analitos, o padrão interno e possíveis interferentes endógenos e exógenos, como cloreto, sulfato, sulfito, citrato e lactato, adicionados em solventes e extratos de amostras de camarão e carne bovina. Os analitos foram adicionados em uma concentração de 150 mg L⁻¹ e os interferentes em 50 mg L⁻¹. Além disso, foram examinadas 10 amostras brancas para polifosfatos para verificar se havia interferentes próximos aos tempos de migração dos analitos.

3.2.7.2. *Linearidade e efeito de matriz*

A avaliação da linearidade e do efeito de matriz foi feita utilizando três diferentes tipos de curvas de calibração com padronização interna: (I) Curva de calibração em solução, preparado em solvente e fortificada com o analito por meio de diluições sequenciais da solução estoque padrão, (II) Curva de calibração em matriz branca, preparada por fortificação do analito diretamente em uma matriz isenta do analito e (III) Curva de calibração em extrato de matriz branca, preparada a partir do extrato de uma matriz branca e fortificada com o analito por meio de diluições sequenciais da solução estoque padrão. As curvas de calibração continham sete níveis de concentração, incluindo o zero. A faixa foi de 10 a 125 mg L⁻¹ para o trimetafosfato e o pirofosfato, e de 40 a 140 mg L⁻¹ para o tripolitafosfato e o ortofosfato. Todas as curvas analíticas foram preparadas em triplicata para cada nível de concentração.

O efeito de matriz foi avaliado pela comparação das razões das inclinações das diferentes curvas analisadas. De acordo com (HOFF et al., 2015), se as razões de inclinação estivessem entre 0,9 e 1,1, os efeitos de matriz poderiam ser desprezados.

A linearidade foi estudada a partir de curvas preparadas em solvente com três réplicas (n = 3) em três dias diferentes e com dois analistas diferentes. Foi avaliada a média dos coeficientes de determinação (R²), que deve ser de pelo menos 0,99, a distribuição dos resíduos e a significância da regressão linear através do teste F.

3.2.7.3. *Precisão e exatidão*

A exatidão avaliada pela recuperação e as precisões (repetibilidade e precisão intermediária) para os polifosfatos foram determinadas por meio da análise da matriz em branco fortificada em três níveis 10, 75 e 125 mg L⁻¹ para trimetafosfato e pirofosfato e 40, 100 e 140 mg L⁻¹ para tripolifosfato). Para o ortofosfato a recuperação e a precisão foram determinadas por meio da análise em extrato de matriz fortificado em três níveis 40, 100 e 140 mg L⁻¹. Foram avaliadas sete replicatas independentes para cada nível, injetados aleatoriamente e repetindo os preparos ao longo de três dias diferentes de análise, com dois analistas diferentes e matrizes diferentes. Nos dias 1 e 3 de validação foi usada como matriz carne bovina moída e no dia 2 foi utilizado camarão. Os resultados foram calculados usando curvas de calibração em solvente preparadas em triplicata analisadas no mesmo dia. Os parâmetros foram calculados com Anova de fator único com nível de significância de 95%.

3.2.7.4. *Limites de detecção, quantificação*

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados com base na relação sinal/ruído (LD, sinal/ruído ≥ 3 ; LQ, sinal/ruído ≥ 10).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Desenvolvimento do método

A utilização do *software Peakmaster*[®] auxilia no desenvolvimento de métodos por CZE, pois é possível determinar os componentes do eletrólito de corrida e alguns dos parâmetros experimentais com um número reduzido de experimentos (SPUDEIT et al., 2016). Para poder utilizar o *software Peakmaster*[®] é necessário conhecer os valores de pKa e mobilidade iônica dos analitos. Essa ferramenta possui em sua biblioteca as informações de muitas substâncias, inclusive o ortofosfato, entretanto não constam os dados dos polifosfatos (pirofosfato, tripolifosfato e trimetafosfato). Por esse motivo, foi necessário inserir no *software* os valores de pKa calculados pelo *software Chemicalize* e determinar experimentalmente suas mobilidades iônicas para também serem inseridas no banco de dados do *Peakmaster*[®]. Os valores que já estavam listados no software e os valores inseridos de mobilidade e pKa e encontram-se na Tabela 16.

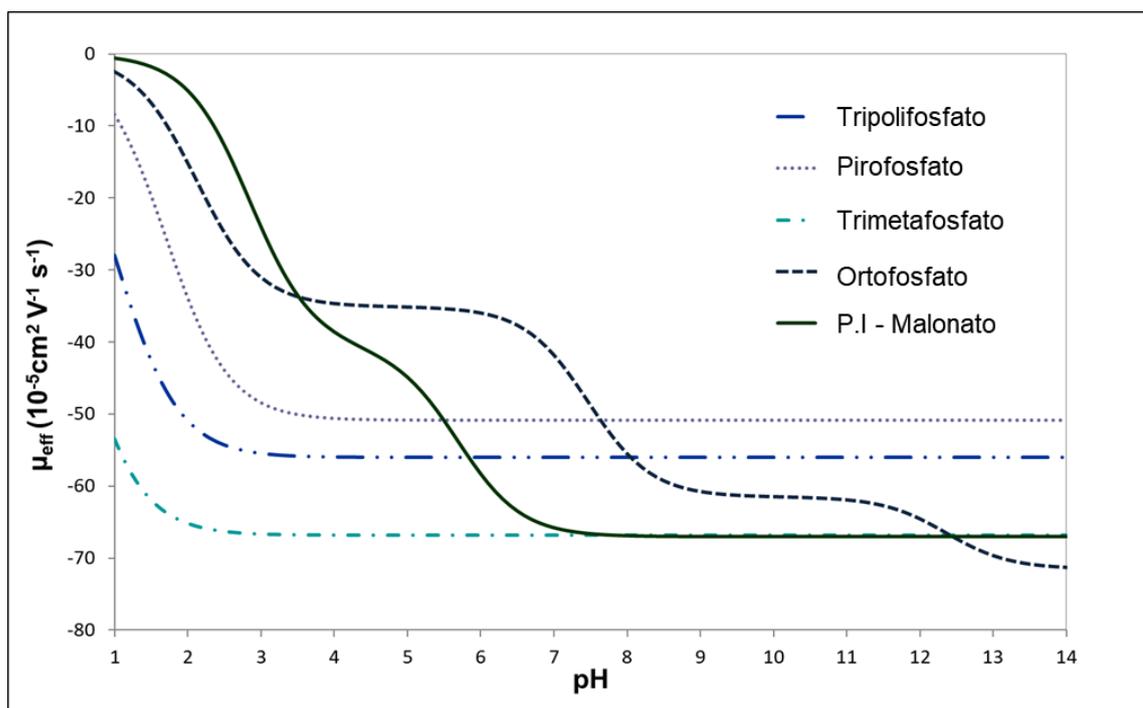
Tabela 16. Medidas de mobilidades iônicas calculadas pelo método de Williams e Vigh e valores de referência do Peakmaster

Analito	pKa	μ experimental ($10^{-5}\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Dados do <i>Peakmaster</i> [®]
Cloreto	-2,0	$80,6 \pm 2,1$	79,1
Ortofosfato	2,2; 7,2 e 12,7	-	34,6; 61,4 e 71,5
Pirofosfato	1,70; 3,06; 6,98 e 8,17	$50,9 \pm 8,0$	-
Trimetafosfato	0,4; 1,30 e 2,24	$66,8 \pm 5,1$	-
Tripolifosfato	1,0; 2,3; 3,7 e 8,5	$56,0 \pm 8,1$	-

Os dados de mobilidade para compostos com mais de um hidrogênio dissociável costumam gerar valores crescentes de mobilidade de acordo com o aumento do número de hidrogênios dissociados, como observado para o ácido fosfórico. Entretanto, para os ácidos pirofosfórico, trimetafosfórico e tripolifosfórico foi observada uma variação da mobilidade diferente do que se era esperado. Foi observado que variando o pH do eletrólito, mesmo em grandes amplitudes, a mobilidade dos polifosfatos variava pouco. De acordo com a literatura, os poliânions, como os derivados dos ácidos citados, possuem comportamento diferenciado que faz com que as variações de suas mobilidades não dependam significativamente do pH do meio

(STOVER; KEFFER, 1993; WANG; LI; ZHANG, 2015). Esse comportamento anômalo é explicado em alguns trabalhos pela interação dos polifosfatos com o eletrólito e com o próprio capilar que acaba afetando a mobilidade desses, sendo assim a migração dos polifosfatos não são completamente explicadas pelas considerações de pKa e mobilidade convencionais. Além disso, a força iônica do meio afeta as mobilidades dos íons polivalentes numa maior extensão do que os íons de menor carga (STOVER, 1999; WANG; LI; ZHANG, 2015). Dessa forma, um tratamento adequado que pode ser adotado é o cálculo da média das mobilidades obtidas na faixa de pH estudada. Com essas mobilidades médias e pKa foi possível construir as curvas de mobilidade dos analitos de interesse usando o software SIMULSC[®] e o gráfico está apresentado na Figura 19.

Figura 19. Gráfico de mobilidade efetiva versus pH para os valores das mobilidades médias dos polifosfatos



Fonte: Elaborado pela autora

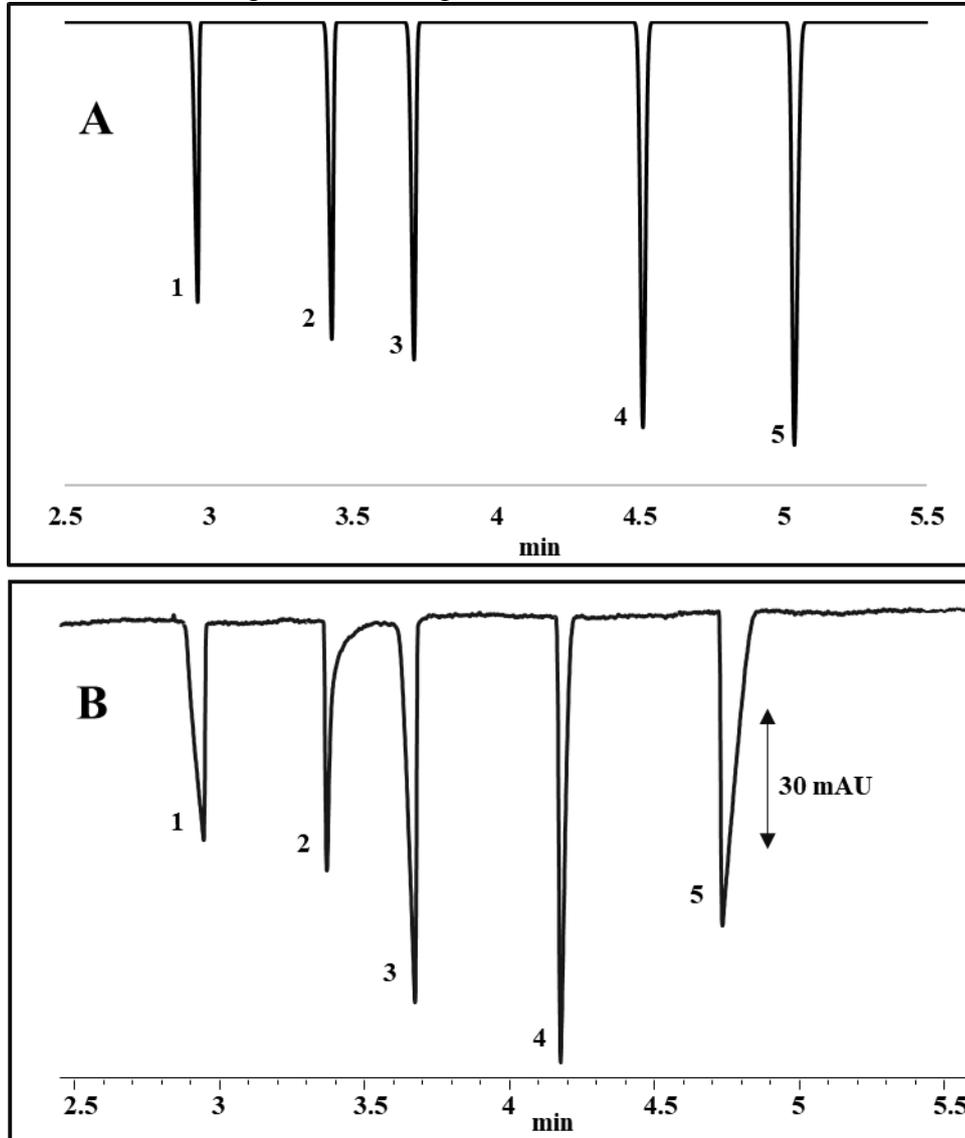
Com as curvas de mobilidade foi possível constatar que a faixa de pH entre 3,5 e 5,0 foi a melhor para a separação dos polifosfatos, ortofosfato e o malonato, escolhido como padrão interno por possuir mobilidade próxima dos analitos e por já ser conhecido por atuar como um bom padrão interno para métodos indiretos de determinação de ânions por CZE (GONÇALVES et al., 2020).

O *software* Peakmaster[®] foi utilizado para otimizar as composições dos eletrólitos de corrida e alguns parâmetros da análise. Foram selecionados e testados experimentalmente quatro eletrólitos de corrida diferentes na faixa de pH ideal. Os ácidos ftálico, maleico e fumárico foram testados como co-íon por absorverem na região do UV, permitindo assim o modo de detecção indireta, e por possuírem mobilidades próximas das mobilidades dos polifosfatos minimizando assim os efeitos de dispersão e assimetria dos picos. Como contra-íon foram testados a β -alanina e ácido aminocapróico que possuem pKa de 3,4 e 4,4 respectivamente, e fornecem capacidade tamponante.

Em soluções de pH igual ou inferior a 4, a mobilidade do fluxo eletroosmótico (EOF) é praticamente insignificante. No entanto, ao se recorrer à inversão do fluxo, é possível aumentar a mobilidade do EOF, o que contribui para a eficácia na separação dos analitos. Inicialmente, o Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), uma substância comumente utilizada para promover a inversão do fluxo em CZE, foi testado, porém não resultou na obtenção da resolução adequada entre os analitos. Conseqüentemente, optou-se pela utilização do SAQQ, que possibilitou a inversão do fluxo do EOF e, por conseguinte, a separação eficiente dos analitos.

Os eletroferogramas com as melhores separações em termos de linha de base, estabilidade do eletrólito e capilar, bem como resolução entre os analitos e os possíveis interferentes, foram obtidos utilizando o eletrólito de corrida contendo 30 mmol L⁻¹ de ácido fumárico e 60 mmol L⁻¹ ácido aminocapróico, com pH de 4,08, força iônica 55,9 mmol L⁻¹ e capacidade tamponante de 50,7 mmol L⁻¹. A Figura 20 demonstra que a otimização dos principais parâmetros de separação com o auxílio do Peakmaster[®] foi capaz de fornecer um método por eletroforese capilar capaz de separar os analitos e o padrão interno.

Figura 20. Eletroferogramas para a separação dos analitos. (A) simulação utilizando o *software* Peakmaster® e (B) eletroferograma experimental em solução padrão. 1- trimetafosfato; 2- tripolifosfato; 3- pirofosfato; 4- P.I malonato e 5- ortofosfato.

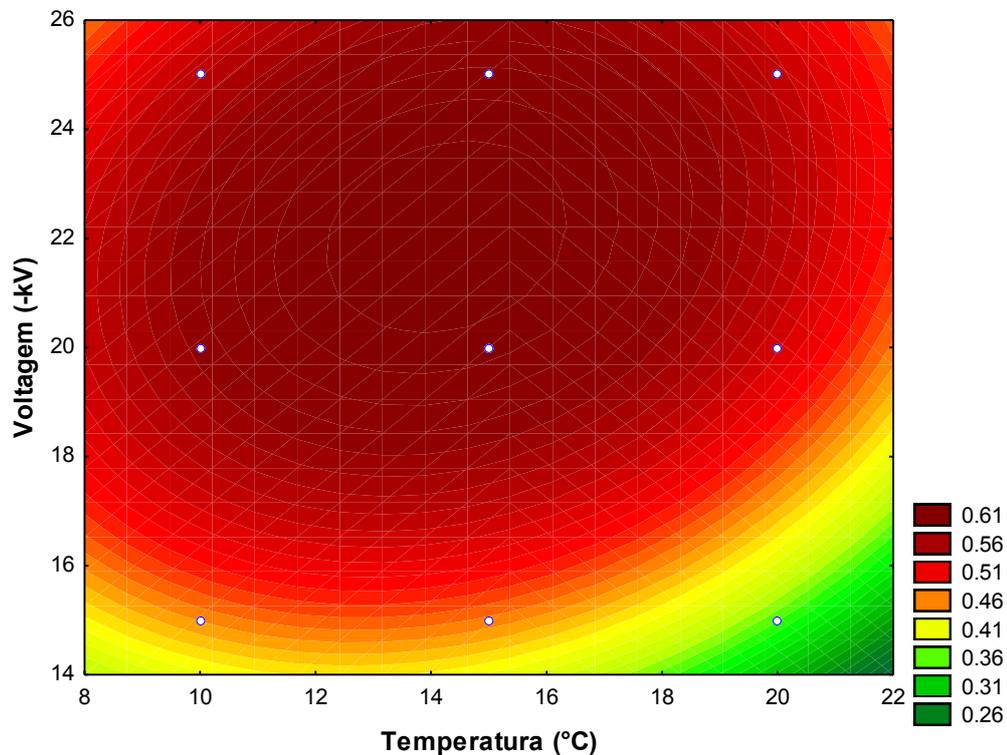


Fonte: Elaborado pela autora

Os parâmetros temperatura e voltagem foram otimizados por meio do planejamento fatorial completo em três níveis. A resposta foi avaliada com base no tempo total de análise e a resolução entre o par crítico formado pelo sinal do pirofosfato e do possível interferente das amostras, o sulfito, que pode estar presente em amostras de camarões e outros crustáceos. Apesar de ser um íon instável em sua forma livre, facilmente convertido em sulfato durante o processo de extração, optou-se por obter a maior resolução com o pirofosfato, visando possíveis amostras com concentrações elevadas de sulfito. Os resultados do planejamento estão

apresentados no apêndice B e a superfície de resposta na Figura 21. A melhor condição foi alcançada com 22,1 kV (polaridade negativa) e temperatura de 13,8 °C. A temperatura final do método foi estabelecida em 15 °C para que o equipamento de eletroforese capilar pudesse alcançá-la e mantê-la com mais facilidade, e a voltagem foi definida como 22 kV com a polaridade negativa na extremidade de injeção do capilar.

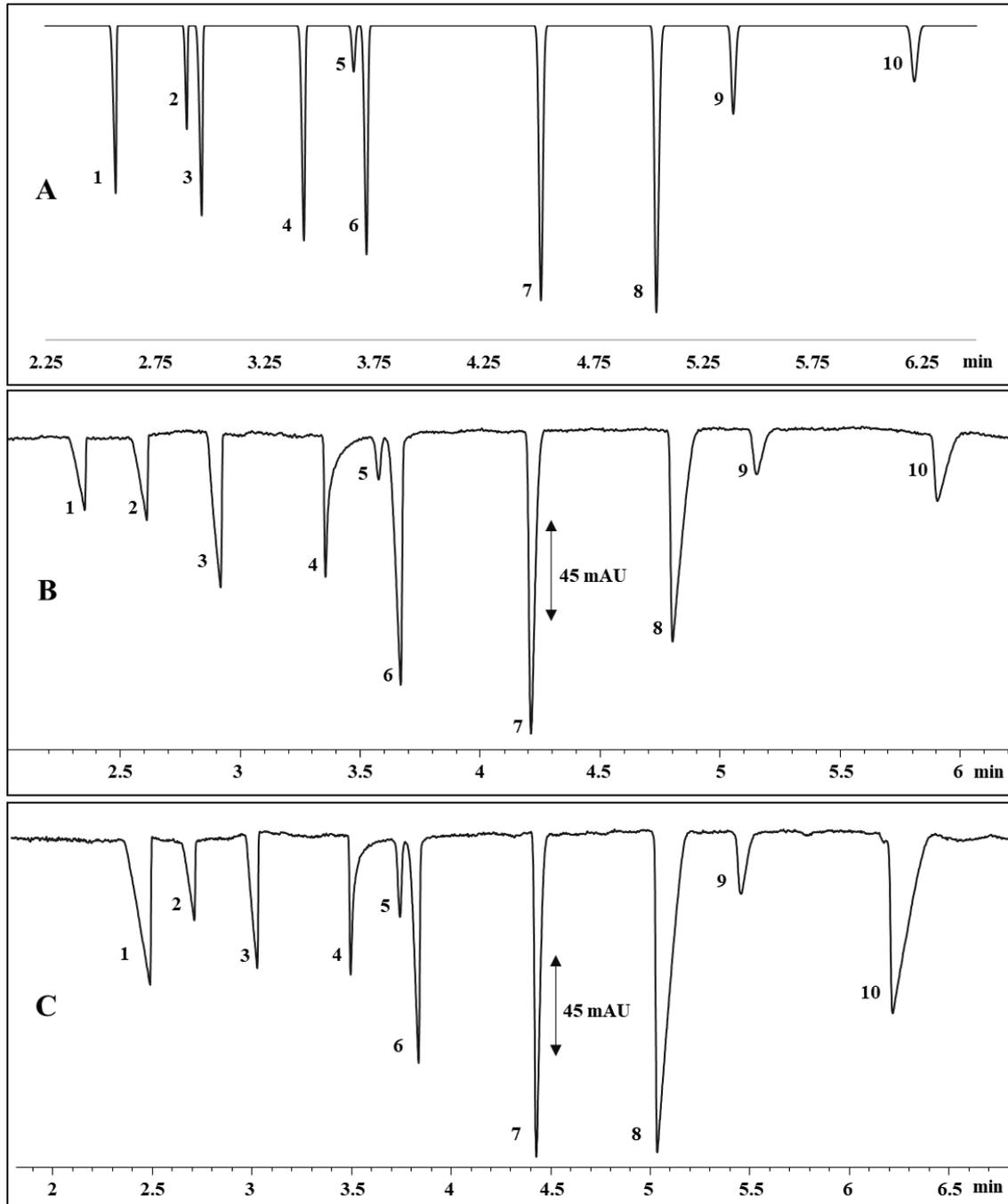
Figura 21. Superfície de resposta gerada através da otimização simultânea da temperatura e da voltagem utilizada na separação por eletroforese capilar



Fonte: Elaborado pela autora

Com base nas condições otimizadas, foi possível separar os analitos e interferentes presentes em amostras de carne e peixe em menos de 6 minutos, com resoluções iguais ou superiores a 1,5, utilizando um capilar de sílica revestido internamente com SAQQ. A Figura 22 demonstra que as condições simuladas no Peakmaster estavam de acordo com os resultados experimentais, tanto para a análise de padrões (Figura 22B) quanto para análises em amostras de alimentos, como camarões (Figura 22C).

Figura 22. Eletroferogramas para a separação dos analitos e interferentes. (A) simulação utilizando o *software* Peakmaster®, (B) eletroferograma experimental com solução padrão dos analitos e (C) eletroferograma experimental de uma amostra de camarão fortificada com solução padrão dos analitos. 1- Cloreto; 2- sulfato; 3- trimetafosfato; 4- tripolifosfato; 5- sulfito; 6- pirofosfato; 7- P.I malonato; 8- ortofosfato; 9- citrato e 10- lactato.



Fonte: Elaborado pela autora

3.3.2. Estabilidade do capilar revestido com SAQQ

Com o objetivo de verificar a durabilidade dos capilares com revestimento interno de SAQQ, foram realizadas 81 injeções consecutivas de três soluções contendo os padrões dos analitos em solvente, uma solução de amostra de camarão e outra de carne, ambas fortificadas com os analitos. O revestimento não foi destruído ao longo da sequência de análises. No entanto, devido ao desgaste que ocorre durante as corridas, uma variação no tempo de migração dos analitos era esperada. Os tempos de migração foram medidos em cada uma das corridas e, na última injeção dentre as 81 realizadas, a maior variação de tempo observada foi de 4,8% para o P.I.

Para garantir a reprodução adequada do método foi estabelecida uma variação máxima de tempo dos analitos de 5%. Quando atingida essa variação para qualquer dos analitos ou P.I o capilar era condicionado novamente com SAQQ conforme o item 2.2.3.

3.3.3. Preparo das amostras

Devido à presença endógena da enzima fosfatase nas matrizes alimentícias, é necessário aplicar um procedimento que garanta a inativação dessa enzima para que não ocorra catalise da reação de hidrólise, que converte os polifosfatos em ortofosfato. Em matrizes como carnes e pescados, existem diferentes espécies de fosfatase que podem ser inativadas em temperaturas que variam de 55 a 75 °C. Por isso, a forma mais comum de inativar essa enzima é por meio do aquecimento e da cocção da amostra (KUDA; TSUDA; YANO, 2004; ZINDER; HERTZ; OSWALD, 1984).

Kim e colaboradores (KIM et al., 2020) utilizaram amostras de camarão para comparar as duas formas mais recorrentes na literatura de inativar a fosfatase: o procedimento com aquecimento em micro-ondas e o aquecimento em banho. O tratamento em micro-ondas foi o mais eficaz para inativar a enzima. Por ser mais prático e conseguir atingir as temperaturas de inativação mais rapidamente, inclusive em amostras congeladas e resfriadas, o método de aquecimento por micro-ondas foi escolhido para inativar a fosfatase. Todas as amostras analisadas foram aquecidas até atingirem 75 °C e só então foram homogeneizadas e extraídas.

Devido à baixa solubilidade dos polifosfatos em solventes orgânicos, somente água foi utilizada para a extração. Não houve necessidade de precipitar proteína, pois devido ao processo

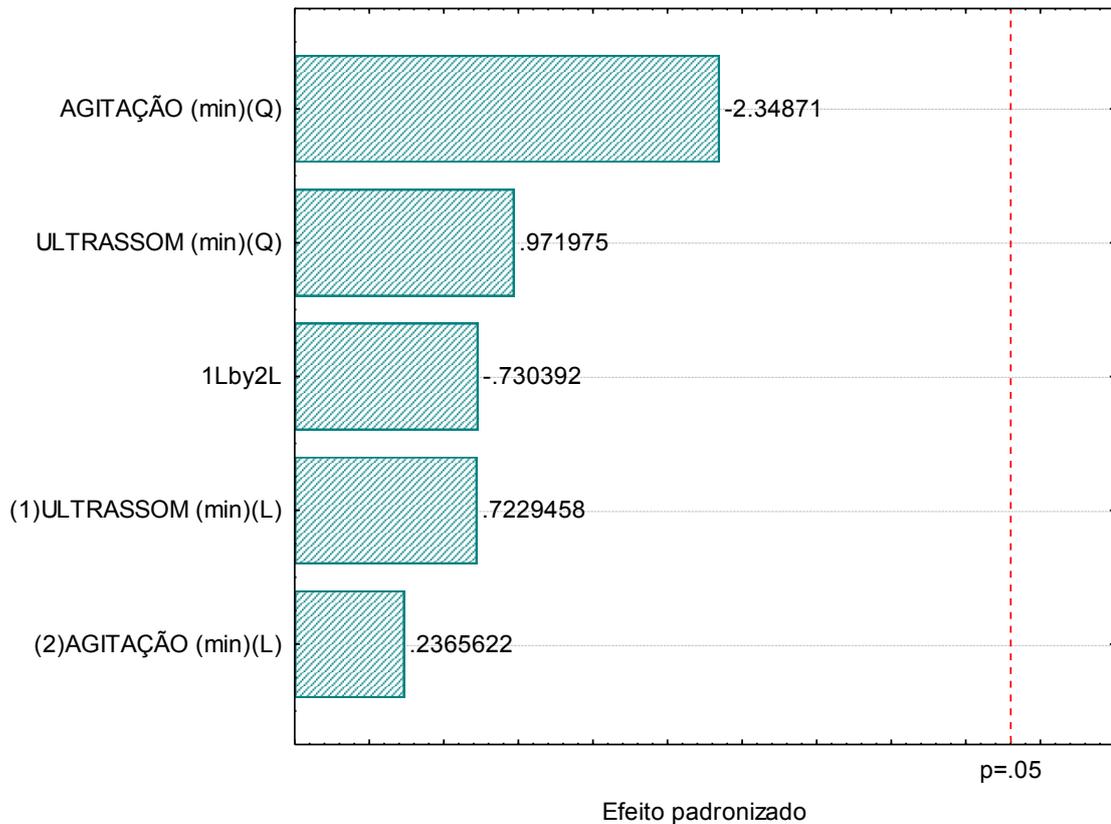
de revestimento da parede do capilar com SAQQ, as proteínas não são capazes de adsorver na superfície do capilar. Sendo assim, elas não alteram o fluxo eletrosmótico e as separações por eletroforese capilar.

Para cada amostra, utilizou-se 5 g de massa, e foram testados volumes de 10, 15, 20 e 25 mL de água para extração. O único volume que não foi possível utilizar foi o de 10 mL, que devido à baixa quantidade de água e à elevada massa de amostra, dificultou a centrifugação e a coleta dos extratos de amostras de produtos cárneos com maior teor de gordura. Os outros três volumes foram adequados, no entanto, optou-se por usar o volume de 15 mL de água para não prejudicar a determinação das amostras com baixa concentração dos analitos.

Existem diversas abordagens descritas na literatura sobre os procedimentos para extração de polifosfatos, algumas delas baseadas em agitação, em ultrassom, algumas que combinam ambos os métodos ou que não utilizam nenhum desses, somente homogeneização em ultraturrax. Sendo que em alguns casos, a duração dessas etapas pode alcançar até 30 minutos (BRASIL, 2022; CUI; CAI; XU, 2000; KAUFMANN et al., 2018; KIM et al., 2020; XIE et al., 2020). Por não haver consenso na utilização de cada uma dessas técnicas e no tempo que deve ser utilizado para garantir a extração dos polifosfatos, foi realizado um planejamento experimental com uma matriz Doehlert para dois fatores: tempo de agitação e tempo de ultrassom.

A resposta foi avaliada pela área do pirofosfato, que era o único polifosfato presente na amostra, e com base nisso, um gráfico de Pareto foi construído, como mostrado na Figura 23. Além da influência individual de cada parâmetro, foi avaliada a influência da combinação das variáveis. Os resultados foram adequados e com coeficiente de determinação (R^2) foi 0,80, não houve falta de ajuste entre os dados e o modelo matemático ($p = 0.73$) e o erro puro foi baixo, seu valor foi 0,003. Com os resultados do Pareto verificou-se que nem a agitação nem o ultrassom foram significativos para a extração dos polifosfatos. Neste caso, foi constatado que apenas o processo de homogeneização com água utilizando o ultraturrax foi suficiente para extrair os polifosfatos. Essa eficácia pode ser atribuída ao fato de que o homogeneizador é capaz de agitar vigorosamente as amostras em velocidades que podem chegar até 25000 rpm. Esse mesmo procedimento utilizando somente ultraturrax no preparo da amostra é apresentado no manual de métodos oficiais para análise de produtos de origem animal do MAPA para análise de polifosfatos em pescado (BRASIL, 2022).

Figura 23. Gráfico de Pareto com o resultado do planejamento Doehlert para avaliar tempo de agitação e tempo de ultrassom.



Fonte: Elaborado pela autora

3.3.4. Validação

3.3.4.1. Seletividade

A seletividade foi avaliada inicialmente com o *software* Peakmaster[®] simulando a presença dos principais interferentes, que são compostos aniônicos com mobilidades semelhantes às dos analitos e que não absorvem na região do UV-Vis. Diferentes amostras de produtos cárneos e pescados podem conter ânions como cloreto, sulfato, sulfito, citrato e lactato. As simulações realizadas indicaram que esses ânions não afetaram os tempos de migração dos analitos (Figura 22A). Além disso, foram realizadas separações experimentais com fortificação dos interferentes e dos analitos em solvente, amostras de camarão (Figura 22B e 22C) e amostras de carne bovina moída, nas quais não foram observadas comigrações dos analitos com os interferentes.

3.3.4.2. Efeito de matriz e linearidade

Para avaliar o efeito da matriz, comparamos as inclinações das curvas preparadas em solução padrão, em extrato da matriz e fortificadas diretamente na matriz. Foram utilizadas duas matrizes diferentes, camarão e carne bovina moída, correspondendo às amostras de pescado e carnes. Foram avaliadas as razões entre os coeficientes angulares das curvas externas e das curvas fortificadas nas duas matrizes diferentes para os polifosfatos. Para o ortofosfato foi avaliada a razão com fortificação realizada em extrato de matriz diluída (Tabela 17). Como as razões das inclinações dos fosfatos ficaram entre 0,9 e 1,1, não foi observado efeito de matriz, o que levou à decisão de estabelecer a calibração com curvas externas (HOFF et al., 2015).

Tabela 17. Razões entre as inclinações das curvas externas com as curvas preparadas em matriz de camarão e carne

Matriz	Razões entre as inclinações das curvas em solvente e matriz			
	Ortofosfato ^a	Pirofosfato ^b	Trimetafosfato ^b	Tripolifosfato ^b
Camarão	1,05	0,98	0,95	0,97
Carne	1,04	1,02	0,95	1,03

^(a) Razão entre as inclinações das curvas em solvente e em extrato de matriz

^(b) Razão entre as inclinações das curvas em solvente e em matriz

Todas as curvas apresentaram coeficiente de determinação (R^2) maiores ou iguais a 0,99. Os gráficos de resíduos não apresentaram nenhum valor discrepante e nenhuma tendência. O ajuste ao modelo linear foi confirmado para as curvas preparadas para os dois processos de extração através do teste F, que demonstrou que os valores de $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o valor do F_{tabelado} , como mostrado na Tabela 18.

Tabela 18. Valores de F para verificação da significância das regressões lineares para as curvas de calibração para ortofosfato, pirofosfato, trimetafosfato e tripolifosfato.

Analito	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}} (1;19)$
Ortofosfato	16014	4,38
Pirofosfato	7129	4,38
Trimetafosfato	16210	4,38
Tripolifosfato	1932	4,38

n = 21

3.3.4.3. Precisão e exatidão

A precisão do método foi avaliada por meio dos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária e os resultados dos coeficientes de variação obtidos estão apresentados na Tabela 19. A repetibilidade (precisão intra-ensaio) variou de 1,2 a 3,0% e a precisão intermediária (precisão inter-ensaio) variou de 2,7 a 4,7%. Esses valores são considerados adequados segundo a AOAC pois são inferiores a 11% e são adequados segundo o INMETRO pois são inferiores a 5,3% (AOAC, 2016; BRASIL, 2020).

Tabela 19. Valores de precisão e recuperação para ortofosfato, pirofosfato, trimetafosfato e tripolifosfato

Parâmetros para Ortofosfato	Nível de fortificação		
	40 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	140 mg L ⁻¹
Precisão (CV,%) - Repetibilidade ^a	2,8	2,9	3,0
Precisão (CV%) - Precisão intermediária ^b	2,9	3,1	3,7
Recuperação (%) ^b	96,6 ± 2,7	93,8 ± 1,3	94,3 ± 2,7
Parâmetros para Pirofosfato	Nível de fortificação		
	10 mg L ⁻¹	75 mg L ⁻¹	125 mg L ⁻¹
Precisão (CV,%) – Repetibilidade ^a	2,2	2,5	1,2
Precisão (CV%) - Precisão intermediária ^b	4,7	4,7	2,7
Recuperação (%) ^b	97,6 ± 4,1	100,0 ± 1,7	100,3 ± 2,4
Parâmetros para Trimetafosfato	Nível de fortificação		
	40 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	140 mg L ⁻¹
Precisão (CV,%) – Repetibilidade ^a	3,0	2,1	1,2
Precisão (CV%) - Precisão intermediária ^b	3,0	4,2	2,8
Recuperação (%) ^b	95,5 ± 1,0	96,2 ± 3,6	97,2 ± 2,5
Parâmetros para Tripolifosfato	Nível de fortificação		
	40 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	140 mg L ⁻¹
Precisão (CV,%) – Repetibilidade ^a	2,9	1,5	2,6
Precisão (CV%) - Precisão intermediária ^b	3,0	3,4	3,0
Recuperação (%) ^b	93,5 ± 0,4	97,4 ± 4,5	101,1 ± 1,5

^a (n = 7); ^b (n = 21)

Foi realizado um teste de recuperação para verificar a precisão do método, cujos resultados são apresentados na Tabela 19, variando de 93,5% a 101,1%. Esses valores foram considerados adequados de acordo com as normas estabelecidas pelo INMETRO e pela AOAC. O INMETRO define que as recuperações devem estar entre 90% e 107%, enquanto a AOAC estabelece um intervalo de 80% a 110% para os valores de recuperação (AOAC, 2016; BRASIL, 2020). Os valores de precisão e recuperação do método proposto mostram que a inativação da fosfatase foi efetiva e o preparo de amostra adequado para a determinação de polifosfatos em amostras de pescado e produtos cárneos. Wang e seus colaboradores (2015) desenvolveram um método para determinar polifosfatos em pescado, utilizando CZE-DAD com detecção indireta e inativação da fosfatase por alta pressão. Eles obtiveram valores de precisão variando entre 1,65% e 7,80%. Esses resultados são consistentes com os nossos e confirmam que métodos indiretos por CZE-DAD possuem precisão adequada para medir aditivos em matrizes complexas. Seus valores das recuperações ficaram entre 79,1 e 104,6%, sendo o valor inferior inadequado para a faixa de concentração do método. Os autores relataram que houve perda do trimetafosfato ao longo do preparo de amostra, o que pode indicar que o procedimento de inativação da enzima fosfatase não foi adequada para esse analito.

3.3.4.4. *Limites de detecção e quantificação*

Os valores de LD e LQ obtidos pela relação sinal/ruído dos eletroferogramas estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. 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

Analito	LD (mg L⁻¹)	LQ (mg L⁻¹)
Ortofosfato	2,0	6,7
Pirofosfato	2,1	6,9
Trimetafosfato	3,1	10,3
Tripolifosfato	11,7	39,0

3.4. APLICABILIDADE DO MÉTODO

O método proposto foi aplicado em amostras pertencentes a categoria de produtos cárneos e pescado. Os resultados de cada espécie de fosfato expresso como g 100g⁻¹ de P₂O₅ em estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Concentração de fosfatos em amostras de produtos cárneos e pescado.

Amostra	Ortofosfato como P ₂ O ₅ (g 100g ⁻¹)	Pirofosfato como P ₂ O ₅ (g 100g ⁻¹)	Trimetafosfato como P ₂ O ₅ (g 100g ⁻¹)	Tripolifosfato como P ₂ O ₅ (g 100g ⁻¹)
Camarão	0,068±0,007	ND	ND	ND
Filé de peixe	0,283±0,003	ND	ND	0.056±0,008
Presunto 1	0,554±0,008	0,058±0,003	ND	ND
Presunto 2	0,432±0,008	0,012±0,001	ND	ND
Salsicha	0,625±0,010	0,034±0,009	ND	ND

n=3

Tripolifosfato foi encontrado somente na amostra de filé de peixe na concentração de 0,056 g 100g⁻¹ como P₂O₅. Pirofosfato foi encontrado nas amostras de produtos cárneos (presunto e salsicha) em concentrações entre 0,012 e 0,058 g 100g⁻¹ e o trimetafosfato não foi encontrado em nenhuma das amostras. Individualmente todas essas espécies de fosfatos estavam de acordo com os limites da legislação brasileira.

Ortofosfatos estão naturalmente presentes nos tecidos musculares e são provenientes das reações com adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP), que desempenham funções de regulação de energia. As concentrações endógenas de ortofosfato são difíceis de determinar, pois, além de variarem conforme as espécies de animais e suas regiões geográficas, outras inúmeras variáveis estão envolvidas, como atividade da enzima fosfatase, temperatura, pH, tempo e condições de armazenamento, entre outras. (PANSERI et al., 2020). As amostras de presunto 1 e salsicha apresentaram concentrações maiores do que 0,5 g 100g⁻¹ de P₂O₅ para o ortofosfato e o somatório das espécies de fosfatos. No entanto, apenas com esses dados não é possível distinguir se as amostras foram tratadas com concentrações acima do estipulado pela legislação, uma vez que é necessário saber o teor de ortofosfato endógeno (TEIXEIRA et al., 2017). A falta de especificidade da origem do ortofosfato presente nas amostras evidencia a necessidade de métodos analíticos que separem e determinem os teores individuais das outras espécies de fosfato, e não somente o teor de fósforo total.

3.5. ECO-ESCALA

O método CZE para determinação de fosfatos em pescado, carnes e produtos cárneos demonstrou ser excelente para a química verde, pois o valor da eco-escala calculada foi de 87 (Tabela 22). A utilização de capilares revestidos com SAQQ propiciou um preparo de amostra simples e sem a utilização de solventes orgânicos, que fornecem risco ao meio ambiente e a saúde dos analistas. Os reagentes utilizados em todo o método possuem baixo risco, os reagentes que não oferecem risco e não pontuam na eco-escala não foram inseridos na tabela. O consumo de energia pelos equipamentos utilizados foi menor que 0,1 kW/h e não receberam penalizações.

Tabela 22. Eco-escala para o método de determinação de fosfatos por CZE

Reagente	Quantidade	Pictogramas	Risco	Penalização
Pirofosfato de sódio	1	1	1	1
Fosfato de sódio	1	1	1	1
Ácido fumárico	1	1	1	1
Ácido clorídrico	1	2	2	4
Hidróxido de sódio	1	1	1	1
Resíduos	Quantidade		Risco	Penalização
	5		1	5
Risco ocupacional		Risco		
		0		0
Consumo de Energia	Quantidade			Penalização
CE	≤ 0,1 kWh por amostra			0
Micro-ondas	≤ 0,1 kWh por amostra			0
Somatório dos pontos			TOTAL	13
			ECO-ESCALA	87

Foram estabelecidos os valores de eco-escala para os procedimentos oficiais utilizados na quantificação de fosfatos (Tabelas 23 e 24). O método de detecção qualitativa por HPLC com derivatização pós-coluna obteve uma pontuação de 74 pontos, enquanto o método espectrofotométrico para a determinação de fósforo total alcançou 61 pontos. Ambos esses métodos são considerados adequados segundo os princípios da química verde. Enquanto, a abordagem proposta utilizando eletroforese capilar foi avaliada como excelente, com uma pontuação ainda maior de 87, destacando-se como uma alternativa eficaz alinhada aos fundamentos da química verde.

Tabela 23. Eco-escala para o método de determinação de fosfatos por HPLC com derivatização pós coluna

Reagente	Quantidade	Pictogramas	Risco	Penalização
Pirofosfato de sódio	1	1	1	1
Fosfato	1	1	1	1
Ácido sulfúrico	2	1	2	4
Ácido bórico	1	1	2	2
Molibdato de amônio	1	1	1	1
Hidróxido de potássio	1	1	2	2
Resíduos	Quantidade 5		Risco 3	Penalização 15
Risco ocupacional		Risco 0		0
Consumo de Energia	Quantidade			Penalização
HPLC	≤ 0,1 kWh por amostra			0
Banho-Maria	≤ 0,1 kWh por amostra			0
Somatório dos pontos	TOTAL			26
ECO-ESCALA				74

Tabela 24. Eco-escala para o método espectrométrico para determinação de fosfato total

Reagente	Quantidade	Pictogramas	Risco	Penalização
Metavanadato de amônio	1	2	2	4
Ácido nítrico	3	2	2	12
Molibdato de amônio	1	1	1	1
Resíduos	Quantidade 5		Risco 3	Penalização 15
Risco ocupacional		Risco 3		3
Consumo de Energia	Quantidade			Penalização
Espectrofotômetro	≤ 0,1 kWh por amostra			0
Mufla	> 1,5 kWh por amostra			2
Chapa de aquecimento	> 1,5 kWh por amostra			2
Somatório dos pontos	TOTAL			39
ECO-ESCALA				61

3.6. CONCLUSÕES

O método de Williams e Vigh foi aplicado para determinar as mobilidades dos fosfatos e, assim, desenvolver um método de separação indireta por CZE-DAD para ortofosfato, pirofosfato, trimetafosfato e tripolifosfato em alimentos como peixes e carnes. Através do software Peakmaster, os parâmetros de separação foram otimizados, enquanto o processo de preparação da amostra foi estudado e desenvolvido, envolvendo a inativação enzimática da fosfatase por aquecimento em micro-ondas e extração apenas com água. A separação dos fosfatos ocorreu em menos de 6 minutos, e a validação do método atendeu aos critérios estabelecidos. A adoção de capilares de sílica revestidos internamente com SAQQ permitiu a separação dos analitos e preservou a integridade do capilar contra interações com componentes da matriz, como proteínas, eliminando o uso de solventes orgânicos. Dessa forma, o método desenvolvido alcança uma pontuação de 87 na eco-escala, demonstrando excelência nos parâmetros de química verde. Apesar de ter sido aplicado em várias amostras, como camarão, filé de peixe, presunto e salsicha, para obter conclusões mais abrangentes sobre os níveis de fosfatos, é necessário analisar um número maior de amostras em diferentes matrizes alimentares.

CONCLUSÃO FINAL

No âmbito desta pesquisa, a eletroforese capilar com detecção indireta foi aplicada no desenvolvimento de dois inovadores métodos para a quantificação de aditivos em produtos alimentares. O primeiro capítulo abordou a otimização de um método de eletroforese capilar para a determinação de sulfito utilizando derivatização com formaldeído (HMS) em amostras de pescado. Foram propostos dois métodos de extração: extração sólido-líquida e extração líquido pressurizada automatizada, que foi otimizada por meio de planejamento fatorial. O método desenvolvido para a quantificação de sulfito apresentou seletividade, precisão, recuperação satisfatória e limites de detecção e quantificação adequados. Esses resultados destacaram a viabilidade do método, que foi posteriormente incorporado no compêndio de métodos oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para análises de produtos de origem animal.

No segundo capítulo, propôs-se uma nova abordagem para a determinação de fosfatos em amostras de pescado e produtos cárneos, através da eletroforese capilar indireta utilizando capilares revestidos com SAQQ. A colaboração dos softwares Peakmaster® e SIMULSC desempenhou um papel crucial no desenvolvimento deste método, permitindo aprimorar a composição do eletrólito de corrida e determinados parâmetros de separação. A otimização dos parâmetros de voltagem e temperatura, por meio de um planejamento fatorial, possibilitou a obtenção de resoluções adequadas entre os analitos e seus interferentes. Os resultados experimentais concordaram com as simulações, enfatizando a relevância desses softwares. O preparo da amostra para análise de fosfatos revelou-se simples, envolvendo apenas a extração da amostra com apenas água. A utilização de capilares revestidos com SAQQ eliminou a necessidade de uma etapa de limpeza dos extratos, visto que estes revestimentos conferem proteção à parede interna do capilar contra interferentes da matriz, como proteínas.

Os métodos propostos nesse trabalho demonstraram ser adequados a uma rotina analítica de alta frequência analítica, ao mesmo tempo em que se alinham de maneira consistente com os princípios da química verde.

REFERÊNCIAS

- ALVES, V. R. et al. Development of a new method for the determination of 4-hydroxyproline as a measurement of collagen content in meat products and dietary supplements by cyclodextrin-assisted electrokinetic chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 105431, 2023.
- AMATATONGCHAI, M. et al. Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection using glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes–PDDA–gold nanoparticles. **Talanta**, v. 133, p. 134–141, 2015.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. Green chemistry. **Frontiers**, v. 640, p. 1998, 1998.
- AOAC. AOAC 990.31-1995, Sulfites in foods and beverages. Ion exclusion chromatographic method. p. 1, 1995.
- AOAC. Sulfites in Foods. Determination of sulfur dioxide. Optimized monier-williams method. (AOAC official method 990.28). In Association of Official Analysis Chemists International. v. 17th ed, 2000.
- AOAC. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 2016.
- AUN, M. V et al. Aditivos em alimentos. **Revista Brasileira de Alergia e imunopatologia**, v. 34, n. 5, p. 177–186, 2011.
- BJØRKEVOLL, I.; REBOREDO, R. G.; FOSSEN, I. Effect of polyphosphates on the quality of frozen light salted cod (*Gadus morhua* L.) fillets. **Food Control**, v. 78, p. 357–365, 2017.
- BOYCE, M. C. Determination of additives in food by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 22, n. 8, p. 1447–1459, 2001.
- BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Coordenação Geral de Acreditação. Sistema Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Sismetro). Revisão nº 9, de junho de 2020. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. [s.l.] Revisão 09–JUN, 2020.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal.**, 2022.

BRASIL. ANVISA. **RDC nº 778, de 1 de março de 2023. Dispõe sobre os princípios gerais, as funções tecnológicas e as condições de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia em alimentos.**, 2023a.

BRASIL. ANVISA. **Instrução Normativa nº 211, de 1 de março de 2023. Estabelece as funções tecnológicas, os limites máximos e as condições de uso para os aditivos alimentares e os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em alimentos.**, 2023b.

BROWN, R. B.; RAZZAQUE, M. S. **Phosphate toxicity: a stealth biochemical stress factor?** Springer, 2016.

CARLOS, K. S.; DE JAGER, L. S. Determination of Sulfite in Food by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Collaborative Study. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 100, n. 6, p. 1785–1794, 1 nov. 2017.

C.E.M CORPORATION. **Application Notes. Energized Guided Dispersive Extraction (EDGE®) - Automated Extraction System.**

CHEMAXON. **Chemicalize.** Disponível em: <<https://chemicalize.com>>. Acesso em: 5 jan. 2022.

COLLINS-WILLIAMS, C. Intolerance to additives. **Annals of allergy**, v. 51, n. 2 Pt 2, p. 315–316, 1983.

COSTA, A. C. O. et al. Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis—Optimization of the method with inspection of ionic mobilities. **Journal of Chromatography A**, v. 1204, n. 1, p. 123–127, 2008.

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.

DA SILVA, M. et al. A rapid method for simultaneous determination of nitrate, nitrite and thiocyanate in milk by CZE-UV using quaternary ammonium chitosan as electroosmotic flow inverter. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 88, p. 103455, 2020.

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 CARVALHO, L. M.; SCHWEDT, G. Sulfur speciation by capillary zone electrophoresis: Conditions for sulfite stabilization and determination in the presence of sulfate, thiosulfate and peroxodisulfate. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 368, n. 2–3, 2000.

DE CARVALHO, L. M.; SCHWEDT, G. Sulfur speciation by capillary zone electrophoresis: Determination of dithionite and its decomposition products sulfite, sulfate and thiosulfate in commercial bleaching agents. **Journal of Chromatography A**, v. 1099, n. 1–2, 2005.

DE MELO, A. P. Z. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood by PLE-LC-APCI-MS/MS and preliminary risk assessment of the Northeast Brazil oil spill. **Food Analytical Methods**, p. 1–17, 2022.

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

DOBLE, P.; HADDAD, P. R. Indirect photometric detection of anions in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 834, n. 1–2, p. 189–212, 1999.

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.

DUAN, X. et al. A green HPLC method for determination of nine sulfonamides in milk and beef, and its greenness assessment with analytical eco-scale and greenness profile. **Journal of AOAC International**, v. 103, n. 4, 2021.

ELLINGER, R. H. **Phosphates As Food Ingredients**. [s.l.] CRC Press, 2017.

EUROPEAN COMMISSION. **Commission regulation (EU) 2015/647 of 24 April 2015 amending and correcting annexes II and III to regulation (EC) no 1333/2008 of the**

European Parliament and of the council as regards the use of certain food additives. Official Journal of the European Union, 2015.

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.

FDA. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. **Fish and Fishery Products Hazard and Control Guidance (June 2022 Edition)**, p. 1–401, 2022.

FILIK, H.; ÇETINTAŞ, G. Determination of sulfite in water and dried fruit samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with UV–Vis fiber optic linear array spectrophotometry. **Food analytical methods**, v. 5, n. 6, p. 1362–1367, 2012.

FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. The development and application of capillary electrophoresis methods for food analysis. **ELECTROPHORESIS: An International Journal**, v. 20, n. 15-16, p. 3156–3180, 1999.

GALUSZKA, A. et al. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 61–72, 2012.

GONÇALVES, A. A.; DE OLIVEIRA, A. R. M. Melanosis in crustaceans: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 791–799, jan. 2016.

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.

GONÇALVES, A. A.; SOUZA, M. A.; REGIS, R. C. P. Effects of different levels of food additives on weight gain, cook-related yield loss, physicochemical and sensorial quality of Nile tilapia fillets (*Oreochromis niloticus*). **International Food Research Journal**, v. 25, n. 5, 2018.

GONÇALVES, S. et al. Rapid method for the determination of citrate, phosphate and sulfite in seafood by capillary zone electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 321, p. 126705, ago. 2020.

GONÇALVES, S. et al. Simultaneous extraction/derivatization for the analysis of sulfite by capillary electrophoresis: A high-throughput reference method to meet the demand of seafood inspection. **Food Research International**, v. 161, p. 111780, 2022.

GUIMARÃES, C. F. M. et al. The chemical quality of frozen Vietnamese Pangasius hypophthalmus fillets. **Food science & nutrition**, v. 4, n. 3, p. 398–408, 2016.

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.

HOFF, R. B. et al. Cassava-based materials for matrix solid phase dispersion: An alternative for sample preparation in food analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1201, p. 123263, 2022.

HOFF, R. B.; PIZZOLATO, T. M. Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 109, p. 83–96, 2018.

HRYNCZYSZYN, P.; JASTRZEBSKA, A.; SZŁYK, E. Determination of phosphate compounds in meat products by ³¹P-Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy with methylenediphosphonic acid after alkaline extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 673, n. 1, p. 73–78, 2010.

IAMMARINO, M.; DI TARANTO, A.; IENTILE, A. R. Monitoring of sulphites levels in shrimps samples collected in Puglia (Italy) by ion-exchange chromatography with conductivity detection. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 7, n. 2, p. 84–89, 2014a.

IAMMARINO, M.; DI TARANTO, A.; IENTILE, A. R. Monitoring of sulphites levels in shrimps samples collected in Puglia (Italy) by ion-exchange chromatography with conductivity detection. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 7, n. 2, p. 84–89, 2014b.

ISO. **ISO 21748:2017. Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty evaluation**. Genève: ISO, , 2017.

JANKOVSKIENE, G.; DAUNORAVICIUS, Z.; PADARAUSKAS, A. Capillary electrophoretic determination of sulfite using the zone-passing technique of in-capillary derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 934, n. 1–2, 2001.

JORGENSEN, J. W.; LUKACS, K. D. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1298–1302, 1981.

KAUFMANN, A. et al. Analysis of a variety of inorganic and organic additives in food products by ion-pairing liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 22, p. 5629–5640, 2018.

KHAN, M.; LIVELY, J. A. Determination of sulfite and antimicrobial residue in imported shrimp to the USA. **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 100529, nov. 2020.

KIM, H. S. et al. An optimised method for the rapid analysis of condensed phosphates in fishery and processed marine food products using ion chromatography and microwave sample processing. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 37, n. 2, p. 205–215, 2020.

KINROSS, A. D. et al. Comparison of Accelerated Solvent Extraction (ASE) and Energized Dispersive Guided Extraction (EDGE) for the analysis of pesticides in leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1627, p. 461414, 2020.

KUDA, T.; TSUDA, N.; YANO, T. Thermal inactivation characteristics of acid and alkaline phosphatase in fish and shellfish. **Food chemistry**, v. 88, n. 4, p. 543–548, 2004.

LANDERS, J. P. **Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**. 3rd ed ed. [s.l.] CRC press, 2008.

LEE, J. et al. Physicochemical properties of frozen Alaska pollock fillets and surimi as affected by various sodium phosphates. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 3, p. e13530, 2018.

LENG, G. et al. A simple field method for the determination of sulfite in natural waters: based on automated dispersive liquid-liquid microextraction coupled with ultraviolet-visible spectrophotometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1584, p. 72–79, 2019.

MA, M. et al. Quaternary ammonium chitosan derivative dynamic coating for the separation of veterinary sulfonamide residues by CE with field-amplified sample injection. **Electrophoresis**, v. 28, n. 22, p. 4091–4100, 2007.

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

MISSONG, A. et al. Phosphorus forms in forest soil colloids as revealed by liquid-state ^{31}P -NMR. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 179, n. 2, p. 159–167, 2016.

MOLINS, R. A.; KRAFT, A. A.; OLSON, D. G. Adaptation of a Method for the Determination of Soluble Orthophosphates in Cooked and Uncooked Pork Containing Acid-Labile Poly- and Pyrophosphates. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 5, p. 1482–1483, 1985.

NOWAK, P. M.; WIETECHKA-POŚLUSZNY, R.; PAWLISZYN, J. White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 138, p. 116223, 2021.

PANSERI, S. et al. Detection of polyphosphates in seafood and its relevance toward food safety. **Food chemistry**, v. 332, p. 127397, 2020.

PEREIRA-COELHO, M. et al. A green analytical method for the determination of polyphenols in wine by dispersive pipette extraction and LC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 405, p. 134860, 2023.

PIOVEZAN, M. Desenvolvimento de metodologias por eletroforese capilar para avaliação de parâmetros químicos da qualidade de biodiesel. 2012.

QIN, C. et al. Calorimetric studies of the action of chitosan-N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride on the growth of microorganisms. **International journal of biological macromolecules**, v. 34, n. 1–2, p. 121–126, 2004.

RITZ, E. et al. Phosphate additives in food—a health risk. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 109, n. 4, p. 49, 2012.

ROBBINS, K. S. et al. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of sulfite in food. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 21, p. 5126–5132, 2015a.

ROBBINS, K. S. et al. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of sulfite in food. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 21, p. 5126–5132, 2015b.

RULLIERE, C. et al. Studies of polyphosphate composition and their interaction with dairy matrices by ion chromatography and ³¹P NMR spectroscopy. **International dairy journal**, v. 28, n. 2, p. 102–108, 2013.

SEGATO, M. P.; SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F. Eletrocromatografia capilar: contextualização, estado da arte e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 431–440, 2009.

SHELDON, R. A. Metrics of green chemistry and sustainability: past, present, and future. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 1, p. 32–48, 2018.

SILVA JÚNIOR, C. A. DA; JESUS, D. P. DE; GIROTTI JÚNIOR, G. Química Verde e a Tabela Periódica de Anastas e Zimmerman: Tradução e Alinhamentos com o Desenvolvimento Sustentável. **Química Nova**, v. 45, p. 1010–1019, 2022.

SILVERS, K. M.; SCOTT, K. M. Fish consumption and self-reported physical and mental health status. **Public health nutrition**, v. 5, n. 3, p. 427–431, 2002.

SIMÓ, C.; BARBAS, C.; CIFUENTES, A. Capillary electrophoresis-mass spectrometry in food analysis. **Electrophoresis**, v. 26, n. 7-8, p. 1306–1318, 2005.

SOUZU, H.; SATO, M.; KOJIMA, T. Changes in chemical structure and function in Escherichia coli cell membranes caused by freeze-thawing. II. Membrane lipid state and response of cells to dehydration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 978, n. 1, p. 112–118, 1989.

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 Basic concepts in Capillary Electrophoresis. **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.

STOVER, F. S. Capillary electrophoresis of phosphorus oxo anions. **Journal of Chromatography A**, v. 834, n. 1–2, p. 243–256, 1999.

STOVER, F. S.; KEFFER, S. S. Separation of condensed phosphates using capillary zone electrophoresis with indirect UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 657, n. 2, p. 450–454, 1993.

SUN, D.-W. **Handbook of frozen food processing and packaging**. 2^a ed. [s.l.] CRC Press, 2016.

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

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.

TEIXEIRA, B. et al. Control of phosphate levels in seafood products from the Portuguese market: Is there a need for concern? **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 62, p. 94–102, 2017.

THEISEN, S. et al. A fast and sensitive HPLC method for sulfite analysis in food based on a plant sulfite oxidase biosensor. **biosensors and bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 175–181, 2010.

VAN NGUYEN, M. et al. Quantitative and qualitative changes in added phosphates in cod (*Gadus morhua*) during salting, storage and rehydration. **LWT-Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 126–132, 2012.

VISTUBA, J. P. et al. Sub-minute method for simultaneous determination of aspartame, cyclamate, acesulfame-K and saccharin in food and pharmaceutical samples by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1396, p. 148–152, 2015.

VITALI, L. et al. Using multiple short-end injections to develop fast electrophoretic separations—applications in iodide analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 28, p. 4586–4591, 2011.

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

VITALI, L. et al. New multilayer coating using quaternary ammonium chitosan and κ -carrageenan in capillary electrophoresis: Application in fast analysis of betaine and methionine. **Talanta**, v. 123, p. 45–53, 2014.

VITALI, L. et al. Development of a fast method for simultaneous determination of hippuric acid, mandelic acid, and creatinine in urine by capillary zone electrophoresis using polymer multilayer-coated capillary. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 409, p. 1943–1950, 2017.

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

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, R. et al. Highly sensitive and selective sulfite sensors based on solution-gated graphene transistors with multi-walled carbon nanotube functionalized gate electrodes. **Food Chemistry**, v. 290, 2019.

WARNER, C. R. et al. Sulphite stabilization and high-performance liquid chromatographic determination: A reference method for free and reversibly bound sulphite in food. **Food Additives and Contaminants**, v. 4, n. 4, p. 437–445, out. 1987.

WARNER, C. R. et al. Determination of free and reversibly bound sulphite in foods by reverse-phase, ion-pairing high-performance liquid chromatography. **Food Additives and Contaminants**, v. 7, n. 5, p. 575–581, set. 1990.

WILLIAMS, B. A.; VIGH, G. Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis. **Analytical chemistry**, v. 68, n. 7, p. 1174–1180, 1996.

WINIARSKI, J. P. et al. Electrochemical reduction of sulfite based on gold nanoparticles/silsesquioxane-modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 251, p. 522–531, 2017.

WOJNOWSKI, W.; NAMIEŚNIK, J.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for in situ determination of biogenic amines in meat: Estimation of meat's freshness. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 130–138, 2019.

WU, L. et al. Food additives: From functions to analytical methods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 62, n. 30, p. 8497–8517, 2022.

XIE, H.-H. et al. Simultaneous determination of five phosphates in dairy products by ion chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 43, n. 17–18, p. 770–776, 2020.

YANG, K. et al. Establishing a method of HPLC involving precolumn derivatization by 2,2'-dithiobis (5-nitropyridine) to determine the sulfites in shrimps in comparison with ion chromatography. **Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 6, 2019.

YOSHIKAWA, K.; UEKUSA, Y.; SAKURAGAWA, A. Determination of sulphite in wines using suppressed ion chromatography. **Food chemistry**, v. 174, p. 387–391, 2015.

YOZA, N. et al. High-performance liquid chromatographic determination of pyrophosphate in the presence of a 20,000-fold excess of orthophosphate. **Analytical biochemistry**, v. 199, n. 2, p. 279–285, 1991.

ZINDER, B.; HERTZ, J.; OSWALD, H. R. Kinetic studies on the hydrolysis of sodium tripolyphosphate in sterile solution. **Water research**, v. 18, n. 5, p. 509–512, 1984.

ŽUNIĆ, G. et al. Optimization of a free separation of 30 free amino acids and peptides by capillary zone electrophoresis with indirect absorbance detection: a potential for quantification in physiological fluids. **Journal of Chromatography B**, v. 772, n. 1, p. 19–33, 2002.

**APÊNDICE A – RAZÕES DE ÁREA OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES COM OS
FILTROS C1, C3, C4, C7, M2+C9 E C9+G1+C9**

Ensaio	Razão de área					
	C1	C3	C4	C7	M2+C9	C9+G1+C9
1	0.474	0.450	0.538	0.550	0.602	0.651
2	0.543	0.600	0.521	0.491	0.563	0.614
3	0.530	0.481	0.543	0.513	0.676	0.775

**APÊNDICE B – NÍVEIS, VARIÁVEIS E A RESPOSTA OBTIDA PARA O
PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 3² PARA DETERMINAÇÃO DAS
CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E VOLTAGEM PARA SEPARAÇÃO DE
POLIFOSFATOS.**

Ensaio	Fatores e níveis experimentais		Resposta
	Temperatura (°C)	Voltagem (kV)	Rs/t *
1	10	-15	0,45
2	10	-20	0,59
3	10	-25	0,52
4	15	-15	0,42
5	15	-20	0,60
6	15	-25	0,59
7	20	-15	0,38
8	20	-20	0,47
9	20	-25	0,55
10	15	-20	0,61
11	15	-20	0,64
12	15	-20	0,60

*Rs/t = Resolução entre pirofósforo e sulfito/ tempo de análise

