



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR
ELETROFORESE CAPILAR PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATO E
NITRITO EM SUPLEMENTAÇÃO COM BETERRABA**

MARIA EDUARDA DRESCH

Florianópolis
Dezembro/2025

Maria Eduarda Dresch

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR
ELETROFORESE CAPILAR PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATO E
NITRITO EM EM SUPLEMENTAÇÃO COM BETERRABA**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512)

Orientador: Prof. Dr. Luciano Vitali

Florianópolis
Dezembro/2025

A coragem de alguém não é medida por quão forte é o corpo,
mas sim o coração.

- Sarah J. Mass

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Adriane e Valdir, por todo o amor, apoio e por sempre acreditarem no meu potencial. As minhas irmãs, Bibi e Isa, pelos momentos de descontração e conforto, por sempre estarem ao meu lado.

Sou muito grata a você, Gus, por todo o carinho e paciência, e por sempre iluminar meus dias com seu jeito leve e seu sorriso resplandecente, que me motiva nos momentos difíceis. Obrigada por acreditar em mim e deixar toda essa jornada mais leve.

Ao meu orientador, Luciano Vitali, pela dedicação ao longo deste trabalho, e a todos do laboratório LABECC, que ajudaram no aprendizado compartilhando experiências.

Meus agradecimento especial pelas amizades feitas ao longo dessa jornada, em especial a Fernanda, Larissa e Sabrina, que dividiram comigo momentos de estudos mas também de risadas, deixando tudo mais leve. Aos amigos de fora, Malu e Gustavo, que mesmo longe da rotina acadêmica nunca deixaram de me apoiar e sempre torceram por mim

Sou grata aos professores do curso, em especial a banca avaliadora por aceitarem o convite, e pelo tempo dedicado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1. Fontes de nitrato e nitrito.....	12
2.2. Aspectos toxicológicos e o excesso de nitrato e nitrito.....	14
2.3 . A técnica de eletroforese capilar na determinação de nitrato e nitrito..	16
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivos gerais.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Reagentes e solução.....	20
4.2. Instrumentação.....	20
4.3. Softwares.....	21
4.4 Condições experimentais do método para determinação de nitrato e nitrito.....	21
4.5 Preparo de amostras.....	21
4.6 Parâmetros analíticos de mérito.....	22
4.6.1. Seletividade/especificidade.....	22
4.6.2. Linearidade.....	23
4.6.3. Efeito de matriz.....	23
4.6.4. Limite de Detecção e Quantificação.....	23
4.6.5. Precisão.....	23
4.6.6. Exatidão.....	24
4.6.7 Robustez.....	24
4.6.8 Gestão de resíduos.....	25
5 Resultados e discussão.....	25
5.1 Seleção das condições experimentais para separação e determinação de NO ₃ - e NO ₂ por CZE.....	25
5.1.1 Componentes do eletrólito.....	25
5.1.2 Escolha do padrão interno.....	26
5.1.3 Escolha da concentração dos componentes do BGE.....	26
5.2 Parâmetros analítico de mérito.....	29
5.2.1 Seletividade/especificidade.....	29
5.2.2 Linearidade.....	30
5.2.3 Efeito de matriz.....	31
5.2.4 Limite de Detecção e Quantificação.....	32
5.2.5 Precisão.....	32
5.2.6 Exatidão.....	36
5.2.7 Robustez.....	37

5.3 Determinação de nitrato e nitrito nas amostras.....	39
5.4 Comparação com outros métodos da literatura.....	40
6 Conclusão.....	41
7 Referências.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo ilustrativo de matrizes contendo nitrato: vegetais e suplementos de beterraba	13
Figura 2. Estrutura química do nitrato e nitrito inorgânicos	13
Figura 3. Representação esquemática do equipamento e seus principais componentes	17
Figura 4. Esquema do modo de operação da eletroforese capilar por zona.....	18
Figura 5. Perfil do EOF em função do pH para capilares de sílica fundida sem modificação (em preto)	19
Figura 6. Mobilidade eletroforética do nitrato e do nitrito em função do pH ótimo para a separação dos analitos	26
Figura 7. (a) Eletroferograma experimental de separação de solução de sulfeto 20 mg L ⁻¹ com injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 8 s. Condições experimentais da simulação e da corrida experimental: capilar de sílica fundida com comprimento total de 32 cm e efetivo de 24 cm. EOF de 7·10 ⁻⁹ m ² V ⁻¹ s ⁻¹ . Voltagem de separação de -25 kV. Detecção direta em 210 nm. pH 3,9, 30 mmol L ⁻¹ de ácido 6-aminocapróico e 20 mmol L ⁻¹ de ácido clorídrico. (b) Eletroferograma de separação dos analitos simulado no software PeakMaster.....	29
Figura 8. Espectros obtidos sob o sinal de NO ₃ ⁻ e NO ₂ ⁻ em uma amostra enriquecida com os analitos na concentração de 20 mg L ⁻¹	31
Figura 9. Curva de calibração externa de NO ₃ ⁻ e NO ₂ ⁻ pelo método CZE.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Razão entre as curva de calibração externa e por adição de padrão.....	32
Tabela 2. Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos.....	33
Tabela 3. Resultados para a Precisão Instrumental	34
Tabela 4. Resultados da Precisão Intra-dia.....	35
Tabela 5. Resultados da Precisão Inter-dia.....	36
Tabela 6. Valores de recuperação de NO_3^- e NO_2^- por CZE para cada nível de concentração avaliado.....	37
Tabela 7. Parâmetros avaliados para verificação da robustez do método de determinação de nitrato e nitrito por eletroforese capilar.....	38
Tabela 8. Avaliação da robustez do método em relação à área do pico dos analitos.....	39
Tabela 9. Avaliação da robustez do método em relação ao de migração dos analitos.....	40
Tabela 10 Valores obtidos pelo método desenvolvido.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

NO – Óxido nítrico

NO_3^- – Nitrato

NO_2^- – Nitrito

CE – Eletroforese capilar

IDA – Ingestão diária aceitável

CSF – Comitê Científico para Alimentos

JECFA – Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares de FOA/OMS

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IC – Cromatografia Iônica

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

CZE – Eletroforese Capilar de Zona

EOF – Fluxo Eletroosmótico

BGE – Eletrólito de corrida

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

CV – Coeficiente de Variação

PI – Padrão Interno

RESUMO

Esse trabalho propôs o desenvolvimento de um método rápido e eficiente para determinação de nitrato e nitrito em amostras de suplementação contendo beterraba por eletroforese capilar. O software PeakMaster® foi utilizado na otimização das condições experimentais, permitindo selecionar o eletrólito ideal para prever o comportamento da separação. As separações foram realizadas em capilares de sílica fundida, com comprimento total de 32,5 cm e diâmetro interno de 50 µm, pelo modo de detecção direta no comprimento de onda de 210 nm, usando injeção hidrodinâmica de 8 s com pressão de 25 mbar, voltagem de -25 kV e eletrólito compostos por 30 mmol L⁻¹ de ácido 6-aminocapróico e 20 mmol L⁻¹ de ácido clorídrico em pH de aproximadamente 3,9. O método apresentou tempo de análise inferior a 1 minuto e demonstrou boa linearidade ($R^2 > 0,99$), sensibilidade adequada atingindo um LOQ de 0,071 mg L⁻¹ para o nitrato e 0,587 mg L⁻¹ para o nitrito, e precisão intermediária e instrumental com CV < 5%. A aplicação em diferentes amostras demonstrou que o método permite quantificação confiável dos analitos.

Palavras-chave: Eletroforese capilar, Nitrato, Nitrito, Determinação de suplementos

1 INTRODUÇÃO

A crescente conscientização sobre os benefícios de uma dieta rica em frutas e vegetais tem impulsionado o interesse por alimentos funcionais, especialmente a beterraba, destacando-se por seu alto teor de nitrato inorgânico, que contribui para a saúde cardiovascular. O nitrato presente na beterraba, ao ser convertido em óxido nítrico (NO) no organismo, oferece benefícios para a função vascular e metabólica.

Com a popularização da beterraba como suplemento alimentar, especialmente devido aos seus potenciais benefícios no desempenho esportivo e saúde vascular, surge a necessidade de determinar o teor de nitrato presente nesses

produtos. A suplementação com nitrato inorgânico é amplamente utilizada, porém, a quantidade de nitrato presente nos suplementos pode variar significativamente, o que pode impactar sua eficácia e segurança. Dada a importância do nitrato para a conversão em NO e os efeitos vasculares que ele proporciona, é essencial realizar uma determinação precisa e exata do conteúdo de nitrato nesses produtos. Nesse contexto, compreender o comportamento químico do nitrato e as possíveis transformações que ele pode sofrer torna-se fundamental para garantir a qualidade e a confiabilidade dos suplementos analisados.

Além disso, é importante considerar que o nitrato inorgânico (NO_3^-), espécie química termodinamicamente estável, é suscetível à redução em nitrito (NO_2^-) por diferentes mecanismos redox. Tal conversão pode ocorrer por vias endógenas, mediadas por enzimas do tipo nitrato redutase presentes nos tecidos vegetais, ou por processos exógenos, como a ação de microrganismos nitrato-redutores presentes na superfície do vegetal.

Embora técnicas como espectroscopia e eletroanálise sejam utilizadas para a determinação de nitrato em alimentos, a eletroforese capilar (CE) destaca-se como uma alternativa promissora. Essa metodologia apresenta elevado potencial analítico, combinando alta sensibilidade, resolução e rapidez na determinação, além de exigir menores volumes de amostra e reagentes. Tais características tornam a CE uma ferramenta eficiente e sustentável para a determinação de nitrato e nitrito, oferecendo benefícios tanto analíticos quanto ambientais.

Este trabalho justifica-se pela necessidade de avaliar o teor de nitrato e nitrito nos suplementos alimentares de beterraba, permitindo avaliar esses produtos apresentam quantidade adequada para promover os benefícios à saúde, sem representar riscos devido ao consumo excessivo. Além disso, ao realizar essas determinações, busca-se fornecer informações valiosas para a ciência nutricional e para os consumidores, contribuindo para o uso mais seguro e eficaz desses suplementos na prática nutricional e esportiva.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fontes de nitrato e nitrito

O nitrato e nitrito são compostos nitrogenados amplamente encontrados na natureza, presentes no solo, na água e nas plantas, o que faz com que sejam distribuídos em alimentos de origem tanto animal quanto vegetal.^{1,2} Além disso, são frequentemente usados como aditivos alimentares na forma de sais de sódio e potássio, especialmente em conservas, produtos cárneos e queijos, e também como componentes de fertilizantes.¹ O nitrato auxilia no fornecimento de nitrogênio, um nutriente essencial para o crescimento das plantas, entretanto, quando absorvido em excesso, pode se acumular nos tecidos vegetais além do necessário para o desenvolvimento.²

Dentre as fontes alimentares, vegetais de folhas verdes e raízes, como a beterraba, destacam-se por apresentarem elevadas concentrações de nitrato, variando conforme sua forma de cultivo, uso de fertilizantes e condições ambientais.^{2,3} O consumo desses vegetais tem sido amplamente estudado, tanto do ponto de vista nutricional quanto fisiológico, uma vez que o nitrato dietético pode atuar como precursor da via óxido nítrico (NO), exercendo efeitos benéficos sobre a circulação e a função muscular.⁴

Nos últimos anos, é observado um crescimento no uso de suplementos à base de beterraba e outros vegetais ricos em nitrato, desenvolvidos para fornecer doses concentradas e controladas dos compostos.³ Esses produtos vêm sendo amplamente utilizados por atletas e praticantes de atividades físicas, uma vez que o nitrato está associado a melhora na eficiência mitocondrial e a redução do custo energético do exercício.³ A Figura 1, apresenta exemplos ilustrativos das principais matrizes abordadas na literatura, (a) vegetais ricos em nitrato, (b) suplementos alimentares à base de beterraba.

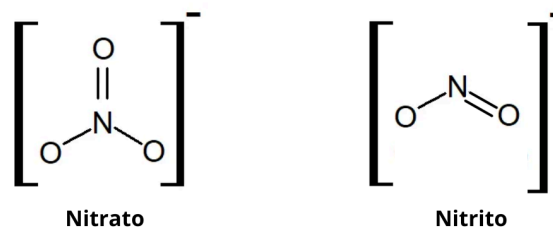
Figura 1. Exemplo ilustrativo de matrizes contendo nitrato: vegetais e suplementos de beterraba



Fonte. Autoria própria (2025).

Segundo a IUPAC, (do inglês “ International Union of Pure and Applied Chemistry”), o nitrato corresponde ao ânion NO_3^- , ou a qualquer composto que o contenha, enquanto o nitrito é definido como anion NO_2^- , ou compostos derivados deste.⁵ Esses íons são originados, respectivamente, dos ácidos oxigenados ácido nítrico (HNO_3) e ácido nitroso (HNO_2) sendo comumente encontrados em sais de sódio e potássio, amplamente distribuídos na natureza e aplicados em diversos setores industriais e alimentares((Figura 2).³

Figura 2. Estrutura química do nitrato e nitrito inorgânicos.



Fonte. Autoria própria (2025).

O consumo desses vegetais e de outros alimentos ricos em nitrato levanta preocupações quanto à qualidade e segurança alimentar. Isso ocorre porque, uma vez ingerido, o nitrato pode ser reduzido a nitrito pela ação de microrganismos na saliva,³ podendo o nitrito reagir com aminas, formando compostos nitrosos, como as nitrosaminas, que são substâncias carcinogênicas.^{3,6} Em crianças, a exposição ao nitrito pode levar a formação da metemoglobinemia, uma condição que prejudica o

transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos, que pode evoluir para óbito em casos mais graves.⁷

Apesar dos riscos, o nitrato também desempenha um papel fisiológico benéfico no organismo. O óxido nítrico (NO), por exemplo, pode ser produzido de duas maneiras: por meio da ação da enzima NO sintase, que converte a L-arginina em NO, ou pela redução do nitrato a nitrito e, posteriormente, a NO na corrente sanguínea.^{3,8} As reservas de nitrato no corpo podem ser aumentadas tanto pela ingestão de alimentos ricos em nitrato quanto pela suplementação de nitrato inorgânico.⁴ A suplementação de nitrato na dieta tem efeitos ergogênicos, ou seja, melhora o desempenho físico e reduz a fadiga muscular, devido ao aumento da eficiência do uso de oxigênio nas mitocôndrias.⁴

A ingestão diária aceitável (IDA) de nitrato e nitrito foi estabelecida por organismos internacionais de referência. O antigo Comitê Científico para Alimentos (CSF) da comissão europeia e o Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/OMS (JECFA), definem o IDA para nitritos em 0,06 e 0,07 mg/kg de peso corporal por dia, e para o nitrato em 3,7 mg/kg de peso corporal por dia.⁹ No Brasil, apenas os embutidos cárneos possuem regulamentação específica quanto ao teor permitido desses aditivos.¹⁰ Considerando os riscos à saúde associados ao consumo excessivo, tornando essencial manter uma ingestão equilibrada desses alimento.

2.2. Aspectos toxicológicos e o excesso de nitrato e nitrito

O nitrato ingerido nos alimentos é parcialmente convertido em nitrito por enzimas de microrganismos presentes na saliva.³ Quando presentes em quantidades elevadas, o nitrito pode oxidar a hemoglobina formando a metahemoglobina, uma forma inativa que compromete o transporte de oxigênio pelo sangue e prejudica a absorção de vitaminas como A e E.¹¹ Diferente do nitrato que é parcialmente eliminado pela urina ou reaproveitado na produção da saliva, o nitrito tende a se acumular e reagir com aminas e amidas presentes presentes no corpo, levando a formação das N-nitrosaminas por meio de uma reação reversível.¹¹

Essa reação que ocorre tanto em alimentos quanto dentro do organismo, é favorecida por ambientes com pH ácido como o estômago, e leva a formação de

compostos nitrogenados potencialmente perigosos à saúde.¹² A presença de N-nitrosaminas e nitritos está associada à geração de radicais livres, que podem danificar células e prejudicar a produção de muco gástrico, um importante fator de proteção da mucosa do estômago, aumentando o risco de câncer gástrico.¹²

Apesar dos riscos, é importante destacar que o papel dos nitratos na saúde humana não se resume a efeitos adversos. Estudos indicam que o consumo elevado de nitrato pode estar relacionado à redução leve no risco de câncer gástrico, especialmente quando sua origem são frutas e vegetais, ricos em antioxidantes como a vitamina C e fibras.^{13,14}

Além da toxicidade potencial, o nitrato e nitrito desempenham papéis fisiológicos importantes, atuando como fontes endógenas para a produção de NO, substância envolvida na vasodilatação, regulação do fluxo sanguíneo, contração muscular e outros.^{15,16} O aumento da biodisponibilidade de NO por meio da via nitrato-nitrito-NO contribui para a melhoria da função cardiovascular, otimização da entrega de oxigênio e nutrientes aos tecidos, maior eficiência energética muscular e redução do consumo de ATP durante a contração retardando a fadiga.^{15,16}

Diante dos múltiplos efeitos fisiológicos, no contexto esportivo, os efeitos combinados da suplementação com nitrato têm sido associados ao aumento da tolerância ao exercício, à melhoria do desempenho em provas de resistência e à redução do tempo até a exaustão. Tais resultados são observados com mais frequência em indivíduos recreativos ou moderadamente treinados, embora atletas de alto rendimento também possam se beneficiar em situações específicas.¹⁵

Diante da complexidade do metabolismo do nitrato e nitrito, dos riscos potenciais associados à formação de N-nitrosaminas e metemoglobina, e dos efeitos fisiológicos benéficos do NO, torna-se essencial equilibrar a ingestão desses compostos na dieta, considerar sua origem e combinar com nutrientes protetores, e compreender os aspectos toxicológicos e fisiológicos para promover a saúde e segurança alimentar, especialmente em grupos mais vulneráveis, como crianças.

Nesse contexto, a compreensão dos efeitos fisiológicos e toxicológicos desses compostos reforça a importância de desenvolver e aperfeiçoar métodos analíticos capazes de quantificar de forma precisa e eficiente o nitrato e o nitrito em diferentes matrizes alimentícias.

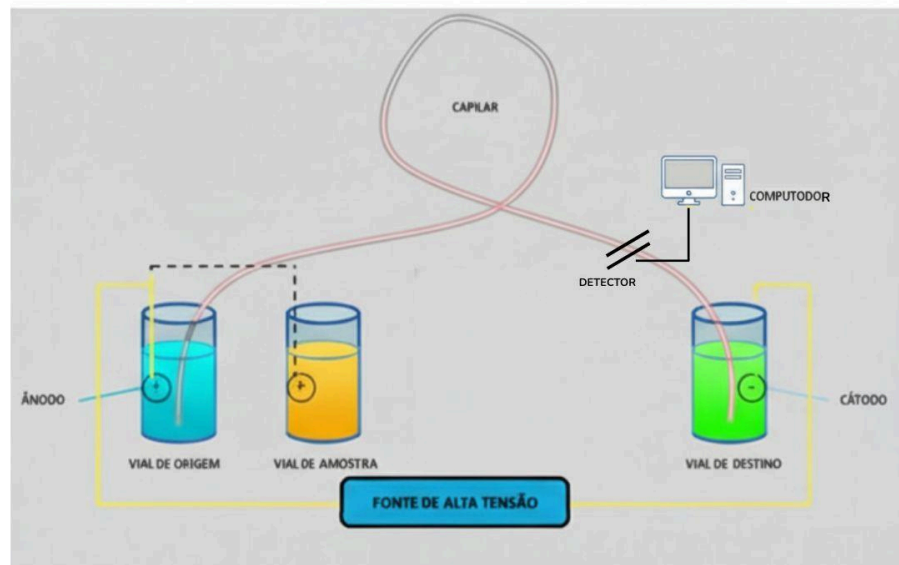
2.3 . A técnica de eletroforese capilar na determinação de nitrato e nitrito

Diversas técnicas podem ser empregadas para a determinação de nitrato e nitrito em vegetais e outras matrizes, incluindo a quimioluminescência,¹⁷ cromatografia (de íons (IC)¹⁸ e líquida de alta eficiência (HPLC)¹⁹), eletroforese capilar^{4,20} e a espectrofotometria.²¹ Entre elas a espectrofotometria é frequentemente escolhida devido ao baixo custo, quanto HPLC e IC oferecem maior sensibilidade e precisão, porém demandam alto volume de amostra, preparo complexo e consumo elevado de reagentes. Técnicas eletroanalíticas, como voltametria²² e métodos por espectrofluorimetria,²³ também são utilizadas, porém apresentam limitações em termos de aplicação rotineira e infraestrutura necessária.

Dentre os métodos disponíveis, a CE vem se destacando como uma alternativa promissora para a quantificação de nitrato e nitrito, especialmente em matrizes alimentares. Isso se deve a combinação de fatores, como alta resolução para separação dos analitos da matriz da amostra, baixo consumo de reagentes e amostras.²⁴ Estudos demonstram que a CE fornece resultados confiáveis e comparáveis aos obtidos por IC, considerado o padrão para determinações de íons inorgânicos.²⁵ Além disso, a técnica se alinha aos princípios da química verde por reduzir volume de solventes e geração de resíduos químicos.

O sistema da eletroforese capilar é composto por diferentes componentes que atuam de maneira integrada para promover a separação dos analitos sob a ação de um campo elétrico. A Figura 3 apresenta um esquema representativo do equipamento, evidenciando seus principais elementos e suas funções.

Figura 3. Representação esquemática do equipamento e seus principais componentes



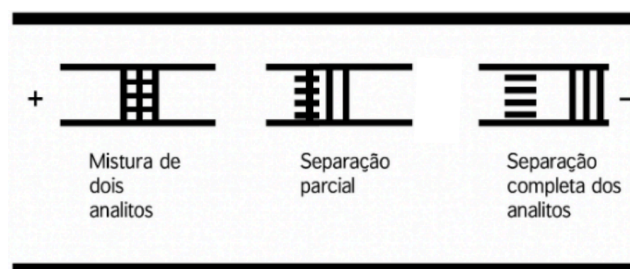
Fonte. Adaptado Pavarini (2011)²⁶

A fonte de alta tensão, que aplica o campo elétrico necessário para impulsionar os íons ao longo do capilar, os reservatórios de tampão, que contém o eletrólito de corrida e fecha o circuito elétrico; o capilar de sílica, onde ocorre a separação dos analitos conforme suas mobilidades e fluxo eletrosmótico, o detector de UV-VIS, que monitora a passagem dos analitos; e o sistema de aquisição de dados, responsável pelo processamento e registro dos sinais obtidos. Com a estrutura do sistema compreendida, é possível entender o princípio que rege seu funcionamento.

A CE é baseada na separação de analitos iônicos e não ionizáveis conforme a mobilidade desses íons em um campo elétrico aplicado.^{24,27} Íons menores e com maior carga migram mais rapidamente, permitindo separações eficientes e em tempo reduzido. Outro ponto relevante é a versatilidade de detecção, sendo o Detector de Arranjo de Diodos (DAD) o mais utilizado, permitindo detecção direta. Quando o analito apresenta grupo cromóforo e absorve na região do UV-VIS, faz-se a detecção direta do analito, normalmente em seu comprimento de onda de máxima absorção,²⁴ ou indireta, quando o analito não absorve na região do UV-Vis, e então um componente do eletrólito absorve e possibilita a quantificação do analito pela diferença de sinais.²⁴

Na técnica de separação da CE existem quatro principais modos de operação que possuem mecanismo diferentes e seletividade característica.²⁸ São eles a Eletroforese Capilar por Zona (CZE), Fronteira Móvel, Isotacoforese e Focalização Isoelétrica. O modo de separação mais utilizado na CE é a Eletroforese Capilar em Zona (CZE). Nesse modo, a amostra é injetada com uma banda estreita em um capilar tamponado, geralmente de sílica fundida. A separação dos analitos ocorre rapidamente devido a diferença de mobilidade efetiva entre os compostos e a relação ao fluxo eletrosmótico (EOF).²⁹ Quando aplicada a diferença de potencial o campo elétrico faz com que os analitos migrem em zonas distintas, cada um em uma velocidade específica, permitindo que os compostos sejam separados ao longo do capilar em diferentes tempos de migração.²⁷ Um esquema dessa separação é mostrado na Figura 4.

Figura 4. Esquema do modo de operação da eletroforese capilar por zona.



Fonte: Adaptado de Tavares (1997)²⁴

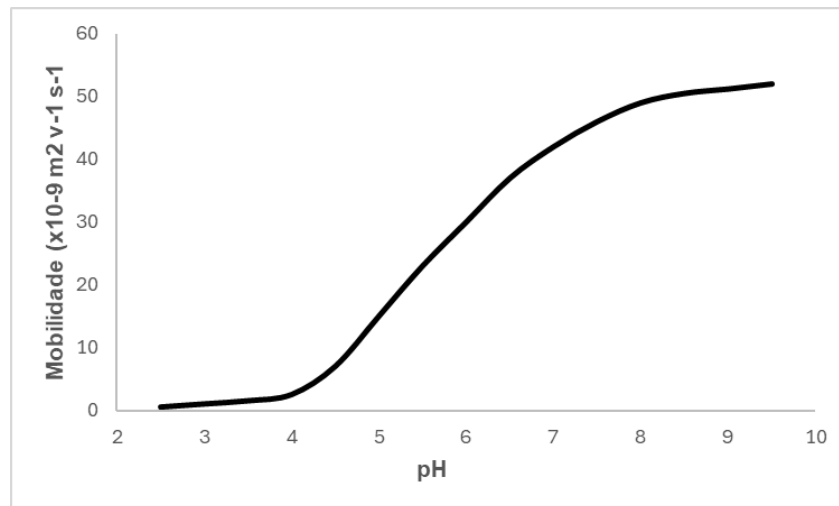
Outra vantagem em se utilizar a CZE é que para este tipo de determinação existe o software de simulação PeakMaster®. Ferramenta essa que auxilia na otimização de parâmetros experimentais simulando pH, força iônica, capacidade tamponante e separação de possíveis interferentes, permitindo maximizar a resolução analítica sem necessidade de experimentação extensiva.²⁷

O EOF é um fator crítico na CE, resultante da interação entre os grupos silanois da parede do capilar com os íons do eletrólito.²⁷ Em pH acima de 6, os grupos silanois se ionizam, e formam uma camada negativa que atrai cátions solvatados gerando um EOF catódico.³⁰ Esse fluxo influencia a migração dos analitos, cátions são acelerados pelo EOF enquanto os ânions migram em direção ânodo, reduzindo sua mobilidade efetiva.²⁷

Em contraste, em meio ácido, os grupos silanois não se ionizam significativamente, tornando o EOF muito baixo ou praticamente nulo (Figura 5).³¹

Nesse cenário a migração dos ânions como o nitrato ocorre principalmente pela própria mobilidade iônica. Para viabilizar essa migração, é realizada a inversão da polaridade do campo elétrico, aplicando-se o potencial na extremidade do detector. Essa abordagem garante separações rápidas e eficientes em meio ácido.

Figura 5. Perfil do EOF em função do pH para capilares de sílica fundida sem modificação (em preto)



Fonte: Adaptado de Vitali (2012)³¹

Dessa forma, a CE combina rapidez sensibilidade, baixo consumo de reagente e versatilidade, consolidando-se como uma técnica robusta para determinação de nitrato e nitrito em diferentes matrizes, adequada para análises de rotina e pesquisas acadêmicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Desenvolver e validar um método analítico para determinação de nitrato e nitrito presentes em amostras de suplementação esportivas utilizando a eletroforese capilar de zona com detector de arranjo de diodos.

3.2 Objetivos específicos

- Utilizar o software PeakMaster® para determinar os componentes do eletrólito e para avaliar as melhores condições experimentais em se tratando de pH da corrida, força iônica, capacidade tamponante, entre outros;

- Comparar o eletroferograma experimental com o eletroferograma da simulação no software PeakMaster® ;
- Validar o método proposto através da avaliação dos parâmetros de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, efeito de matriz, robustez, exatidão e precisão;
- Aplicar o método proposto para determinação de nitrato e nitrito em amostras de suplementação esportiva;
- Comparar o método proposto com métodos da literatura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes e solução

Para o desenvolvimento desse projeto os reagentes utilizados foram de grau analítico. No preparo das soluções foi utilizada água deionizada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), com resistência de até 18 M Ω .cm. Padrões analíticos de nitrato de sódio (NaNO₃), nitrito de sódio (NaNO₂), e ácido bromídrico (HBr) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich, e preparados individualmente em água deionizada para obtenção de soluções com concentração final de aproximadamente 100 mg L⁻¹. As soluções foram preparadas e armazenadas a 4 °C até a determinação.

As concentrações de cada um dos componentes do eletrólito foram preparadas conforme condições de otimização.

4.2. Instrumentação

Para a realização das determinações foi utilizado um equipamento de eletroforese capilar (Agilent Technologies, modelo 7100, Palo Alto, CA, EUA) equipado com um detector de arranjo de diodos e software de aquisição e tratamento de dados fornecido pelo fabricante (ChemStation), disponível no laboratório de Eletroforese Capilar (LabEC) do Departamento de Química da UFSC. As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro Micronal, modelo B 474, com eletrodo de referência de Ag/AgCl, também foi necessário o uso de mini centrífuga Eppendorf modelo Mini Spin Plus, assim como da cuba de ultrassom Cristófoli Biossegurança

4.3. Softwares

Para simulação de separação por CZE, o software Peakmaster® versão 5.3 foi utilizado como ferramenta no desenvolvimento do método. Para o tratamento dos dados foram empregados os softwares ChemStation®, para obtenção e tratamento de dados, e Microsoft Excel® 2016, para construção de gráficos e tratamento de dados.

4.4 Condições experimentais do método para determinação de nitrato e nitrito

Para monitoramento e quantificação do nitrato e nitrito, a determinação foi realizada pelo modo de detecção direta no comprimento de onda de 210 nm. As demais condições, como componentes do BGE, força iônica, pH de separação, capacidade tamponante e padrão interno foram avaliadas por meio do software PeakMaster®. A calibração e quantificação dos analitos nas amostras foram realizadas usando injeção hidrodinâmica de 8 s com pressão de 25 mbar, voltagem de -25 kV, BGE composto de 30 mmol L⁻¹ de ácido 6-aminocaprílico e 20 mmol L⁻¹ de ácido clorídrico em pH de aproximadamente 3,9.

4.5 Preparo de amostras

Foram analisadas quatro diferentes amostras contendo nitrato; Suplemento em pó, suplemento em gel, beterraba em pó e beterraba *in natura*. As amostras foram obtidas em mercados locais, lojas de produtos naturais e suplementos. Todas as amostras, com exceção da da beterraba *in natura*, foram submetidas ao mesmo procedimento de preparo.

Inicialmente foram pesados aproximadamente 12 g de cada amostra e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água deionizada. Em seguida uma alíquota de 1 mL das soluções foram transferidas para um eppendorf de 1,5 mL e submetidas a centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos visando a separação de partículas sólidas. O sobrenadante obtido foi filtrado utilizando filtro de seringa em PTFE hidrofílico com porosidade de 0,22 µm. Após a filtração, as amostras foram submetidas a uma diluição total de 200 vezes antes da determinação por CZE.

Para o preparo da amostra de beterraba *in natura*, foram pesados aproximadamente 24 g do vegetal fresco, os quais foram triturados e transferidos para um balão volumétrico de 250 mL, completando-se o volume com água deionizada. Da solução obtida, uma alíquota de 1 mL foi transferida para um eppendorf de 1,5 mL e centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos visando a separação de partículas sólidas. O sobrenadante obtido foi filtrado utilizando filtro de seringa em PTFE hidrofílico com porosidade de 0,22 μm . Após a filtração, as amostras foram submetidas a uma diluição total de 10 vezes antes da determinação por eletroforese capilar.

Todas as amostras foram preparadas em triplicata e analisadas imediatamente após o preparo. As determinações foram realizadas conforme descrito na seção 4.4.

4.6 Parâmetros analíticos de mérito

A validação permite avaliar, por meio de estudos experimentais, se o método analítico é confiável e atende às exigências das aplicações para as quais será destinado. O método será considerado válido, uma vez que os parâmetros estabelecidos sejam analisados. O método foi validado seguindo as diretrizes determinadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).³² Os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade/especificidade, linearidade, efeito da matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão, exatidão, robustez e estudo de recuperação.

4.6.1. Seletividade/especificidade

A seletividade foi avaliada pelo preparo de uma solução de 20 mg L⁻¹ contendo um mix de possíveis interferências, junto dos padrões dos analitos, e analisando-a para verificar se algum interferente afeta o sinal dos analitos de interesse. A avaliação é realizada pela análise manual dos múltiplos espectros obtidos durante a formação dos picos, permitindo verificar visualmente a singularidade do sinal e confirmar que o analito está adequadamente separado dos interferentes presentes na matriz da amostra.

4.6.2. Linearidade

A linearidade de um método analítico demonstra sua capacidade de produzir uma resposta diretamente proporcional à concentração do analito.³² Para garantir essa proporcionalidade, a linearidade é avaliada por meio da construção de curva de calibração externa em triplicata possuindo 10 pontos de concentração entre 1 mg L⁻¹ a 45 mg L⁻¹, calculando a razão média entre a área do analito e do padrão interno selecionado. A confirmação da linearidade se dá através dos coeficientes de determinação (R^2) e correlação (R), sendo este último obrigatoriamente superior a 0,990.

4.6.3. Efeito de matriz

O efeito de matriz é avaliado por meio do ensaio de recuperação, utilizando cinco concentrações diferentes em amostras fortificadas e calculando a razão média entre a área do analito e do padrão interno selecionado. Paralelamente o efeito da matriz será investigado pela comparação entre a curva de calibração externa e a curva por adição de padrão, ambas em triplicata. Esse procedimento visa verificar se a presença da matriz interfere significativamente na resposta analítica. Considera-se a ocorrência do efeito de matriz quando a variação excede a 10%.

4.6.4. Limite de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LOD) do método foi estimado com base em três vezes a razão entre a leitura do sinal e a altura do ruído (S/R), enquanto o limite de quantificação (LOQ) foi determinado como dez vezes essa razão.

4.6.5. Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da precisão instrumental, repetibilidade e precisão intermediária. A precisão instrumental foi determinada a partir de três injeções consecutivas de três níveis de concentração da faixa de calibração (5, 20 e 40 mg L⁻¹). A repetibilidade intra-dia foi verificada por meio de três replicatas em três níveis de concentração dentro da faixa linear (5, 20 e 40 mg L⁻¹), enquanto que a repetibilidade inter-dia foi realizada por meio três amostras

preparadas em um mesmo dia e determinadas em diferentes dias (5, 20 e 40 mg L⁻¹). A precisão por repetibilidade foi expressa como o desvio padrão relativo, calculado pela razão entre o desvio padrão e a média, multiplicados por 100. Todos os resultados foram expressos como coeficiente de variação, sendo considerados adequados quando inferiores a 10%.³²

4.6.6. Exatidão

A exatidão foi avaliada através do estudo de recuperação. Onde três amostras com concentração conhecida de nitrato e nitrito foram preparadas e fortificadas com padrão (5, 20 e 40 mg L⁻¹). Após a determinação, as concentrações obtidas foram determinadas com base na curva de calibração externa. O percentual de recuperação foi calculado pela razão entre a concentração média experimental e a concentração teórica, multiplicada por 100. Esse valor será utilizado como indicador da exatidão do método.

4.6.7 Robustez

A robustez de um método analítico, indica a sua capacidade de manter resultados consistentes frente a pequenas variações nos parâmetros experimentais.³³ Para sua avaliação, o teste de Youden foi empregado, no qual sete variáveis críticas do método foram selecionadas; pH do BGE, concentração do ácido 6-aminocapróico, tempo de injeção, temperatura do capilar, tamanho do capilar, pressão e tensão aplicada, cada um variando $\pm 10\%$ do valor nominal. Oito experimentos foram conduzidos de acordo com a matriz de Youden e os resultados comparados às condições otimizadas. O método será considerado robusto caso tais variações não ocasionem alterações significativas nos tempos de migração, e concentração determinada.

4.6.8 Gestão de resíduos

A segurança no laboratório é um aspecto crucial para proteção e garantia na integridade dos experimentos. Para isso, foram utilizados equipamentos de Proteção Individual (EPIs), como jalecos, luvas e óculos de segurança. Além disso, vestimentas apropriadas, como calças longas e sapatos fechados, foram utilizadas

para reduzir os riscos durante as atividades. As substâncias químicas foram manuseadas em capelas com exaustores em funcionamento, evitando a exposição a vapores prejudiciais. O descarte de resíduos seguiu critérios rigorosos, com soluções aquosas e orgânicas sendo direcionadas para recipientes apropriados. Materiais contaminados, como luvas e ponteiros descartáveis, serão armazenados até a coleta por empresas especializadas. Além disso, soluções com pH extremo (ácido ou básico) foram tratadas e neutralizadas antes de seu descarte, assegurando tanto a segurança ambiental quanto a do laboratório.

5 Resultados e discussão

5.1 Seleção das condições experimentais para separação e determinação de NO_3^- e NO_2^- por CZE

5.1.1 Seleção do pH e dos componentes do eletrólito

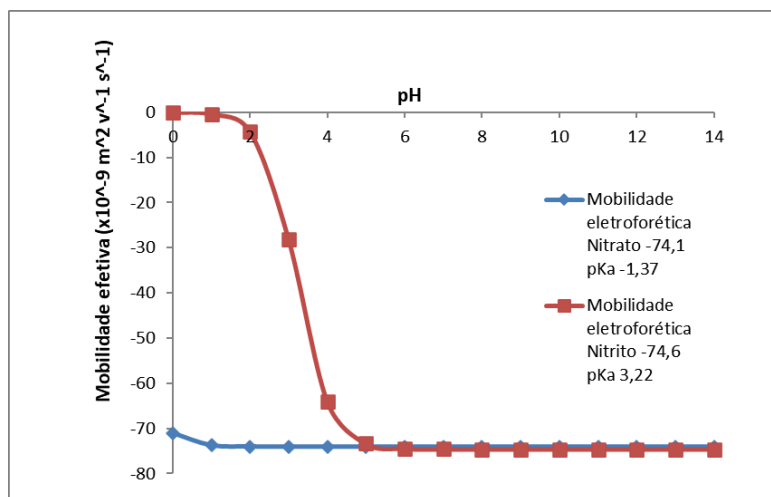
As curvas de mobilidade eletroforética do nitrato e do nitrito, (Figura 6) evidenciam a influência do pH na separação dos analitos. Em pH abaixo de 2 o nitrato apresenta mobilidade máxima enquanto o nitrito, predominantemente na forma protonada (HNO_2), possui mobilidade quase nula, o que impede a separação. Já em pH acima de 5, ambos estão totalmente desprotonados, e exibem mobilidade semelhantes, resultando em co-migração. No pH próximo a 4, observa-se diferença significativa entre as mobilidades efetivas, possibilitando a separação adequada.

A mobilidade efetiva (μ_{eol}) foi calculada conforme a equação 1:

$$\mu_{\text{ef}} = \frac{L_t \cdot L_d}{V \cdot t_m} \quad (\text{equação 1})$$

Onde, L_t é o comprimento total do capilar (cm), L_d o comprimento até o detector (cm), V a voltagem aplicado (V) e t_m o tempo de migração do analito (s). Dessa forma, o pH selecionado para o método foi entorno de 4, por oferecer melhor resolução entre nitrato e nitrito

Figura 6. Mobilidade eletroforética do nitrato e do nitrito em função do pH ótimo para a separação dos analitos



Fonte: Autoria própria (2025)

A seleção dos componentes do eletrólito de fundo (BGE, do inglês “Background Electrolyte”) foi realizada com o auxílio do software PeakMaster 5.3, que permite simular diferentes combinações de co-íons e contra-íons a partir dos valores da mobilidade efetiva. Por meio dessa ferramenta, foram avaliados parâmetros relevantes como, tempo de migração, capacidade tamponante, força iônica, e pH. Inicialmente, foram testados diversos compostos presentes no banco de dados do software, com o intuito de identificar o co-íons e o contra-íon adequados para o método.

Para a escolha do co-íon, considerou-se que este deveria apresentar mobilidade próxima a dos analitos de modo a gerar um sinal simétrico durante a separação. Além disso, era necessário que ele tivesse pKa próximo ao pKa do NO_3^- e NO_2^- sendo eles -1,37 e 3,22 respectivamente, e que não apresentasse grupos cromóforos em sua estrutura, a fim de permitir a detecção direta dos analitos. Dentre os compostos avaliados, o ácido clorídrico (pKa -2) foi selecionado como co-íon mais adequado.

Na sequência, foi definido o contra-íon que também deveria ser um composto não cromóforo e contribuir para a capacidade tamponante do BGE. O ácido aminocaproico (pKa 4,3) foi escolhido, por fornecer essas características.

5.1.2 Escolha do padrão interno

Após a seleção dos componentes do BGE, foi escolhido o padrão interno para auxiliar nas determinações. O padrão interno é determinado pela sua estrutura e mobilidade. Por o método ser em modo direto, o padrão deve ser capaz de absorver radiação na região do UV-Vis, sendo preferível de absorver próximo do máximo do analito para que a determinação seja realizada em um só comprimento de onda. Portanto, alguns compostos foram escolhidos no banco de dados do PeakMaster com mobilidade eletroforética semelhante à dos analitos e que apresentavam absorção na região do UV-Vis. O composto que apresentou a melhor EMD nas condições escolhidas do BGE e que possui as características mencionadas foi o HBr (pka -2), sendo ele escolhido como padrão interno.

5.1.3 Escolha da concentração dos componentes do BGE

A definição da composição do BGE iniciou-se com a consideração das curvas de mobilidade do nitrato e do nitrito, permitindo identificar a região do pH ideal para a separação dos analitos. A partir dessa análise o pH operacional foi fixado em 3,9, garantindo uma separação adequada entre os picos e estabilidade da corrida eletroforética.

Em seguida, as concentrações dos componentes foram estabelecidas em 30 mmol L⁻¹ de ácido 6-aminocapróico e 20 mmol L⁻¹ de ácido clorídrico. Esses valores foram escolhidos considerando critérios de capacidade tamponante, mobilidade do analito e dispersão por eletromigração (EMD), essenciais para assegurar eficiência e reprodutibilidade do método. A capacidade tamponante apresentada pelo BGE é elevada, aproximadamente 20 mM, garantindo a manutenção do pH durante a corrida, a mobilidade dos analitos é adequada para migração rápida e a EMD é mínima, reduzindo a dispersão dos picos.

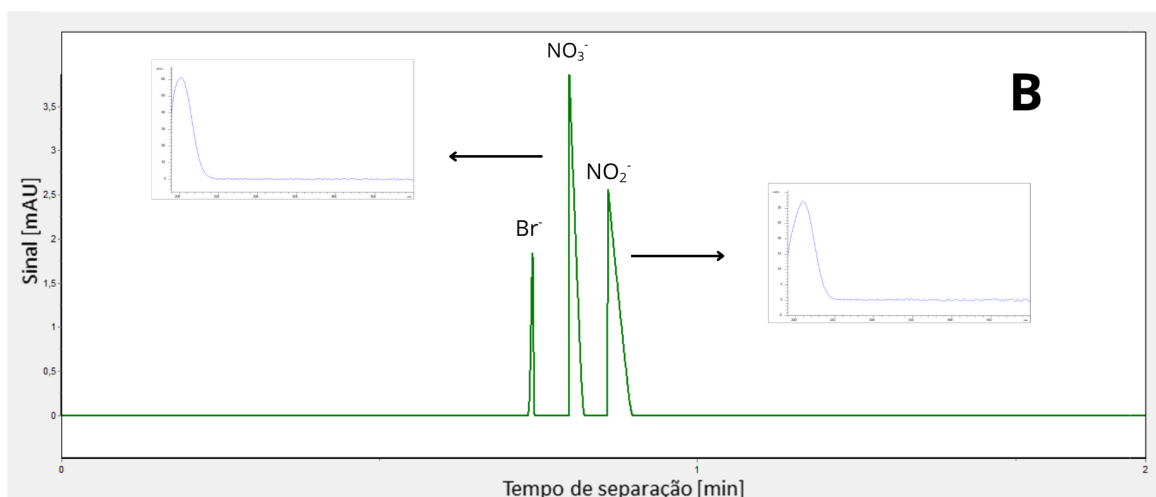
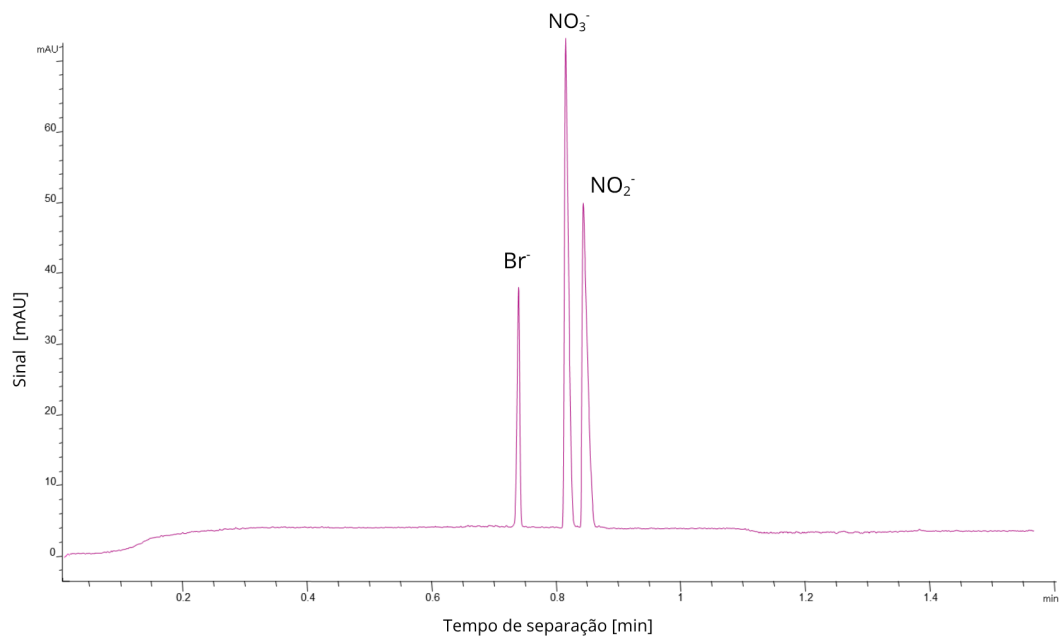
Dessa forma, a composição final do BGE é considerada adequada para a separação dos analitos exsudatos, atendendo aos critérios de eficiência, estabilidade e seletividade necessários para o método.

Depois de escolhidos todos parâmetros para a determinação, uma simulação no software e uma separação experimental no equipamento foram realizadas seguindo as mesmas condições. A Figura 7 mostra um eletroferograma experimental

(A) e a simulação feita (B). É possível observar uma boa correlação entre a simulação e os dados obtidos na separação real, o que indica o uso adequado das ferramentas para seleção dos componentes do BGE.

Figura 7. (a) Eletroferograma experimental de separação de solução de sulfeto 20 mg L^{-1} com injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 8 s. Condições experimentais da simulação e da corrida experimental: capilar de sílica fundida com comprimento total de 32 cm e efetivo de 24 cm. EOF de $7 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Voltagem de separação de -25 kV. Detecção direta em 210 nm. pH 3,9, 30 mmol L^{-1} de ácido 6-aminocapróico e 20 mmol L^{-1} de ácido clorídrico.

(b) Eletroferograma de separação dos analitos simulado no software PeakMaster®.



Fonte: (A) Autoria própria (2025). (B) Peakmaster®.

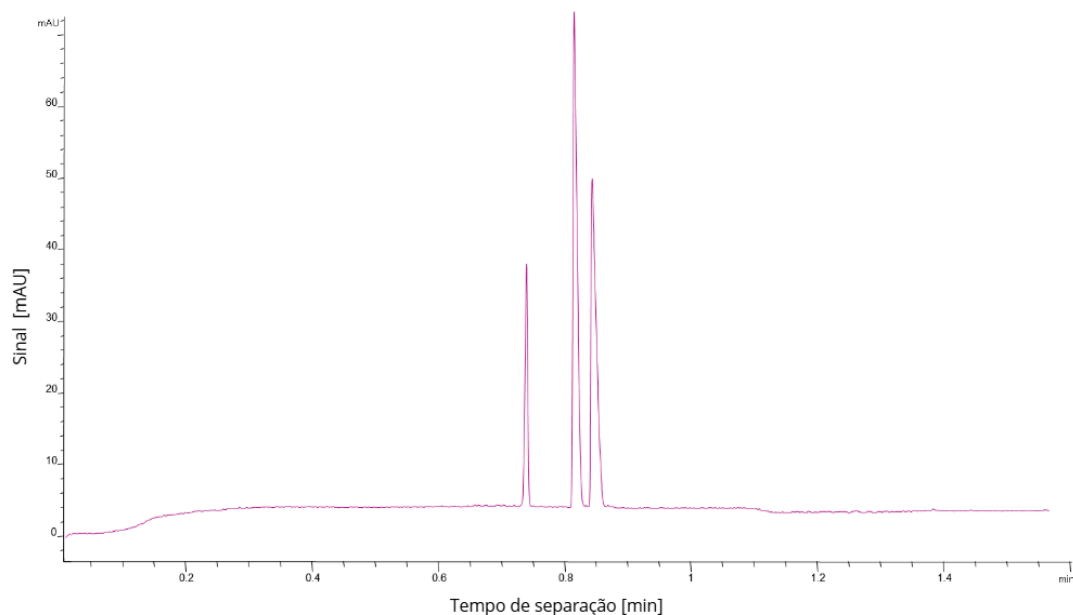
O eletroferograma simulado e experimental apresentam elevado grau de semelhança, para ambos analitos estudados, observa-se na simulação a migração dos analitos em menos de um minuto, sendo igualmente observado no eletroferograma experimental. Esses fatores evidenciam a credibilidade do software e destacam sua importância no desenvolvimento e otimização de métodos por CZE.

5.2 Parâmetros analítico de mérito

5.2.1 Seletividade/especificidade

A seletividade do método foi verificada considerando que os possíveis interferências na matriz, incluindo acetato, sulfato, cafeína e ácido ascórbico, que podem coexistir no suplemento vegetais, ou contaminação do equipamento. Nenhum desses compostos migrou junto com os analitos durante a determinação. Esses interferentes não absorvem radiação eletromagnética na região de 210 nm, utilizadas para detecção dos analitos, ou apresentam mobilidade significativa diferente do nitrato e nitrito. Como ilustrado na Figura 8, o eletroferograma dos analitos foi obtido sem a presença de picos adicionais provenientes de outros compostos, confirmando a seletividade do método.

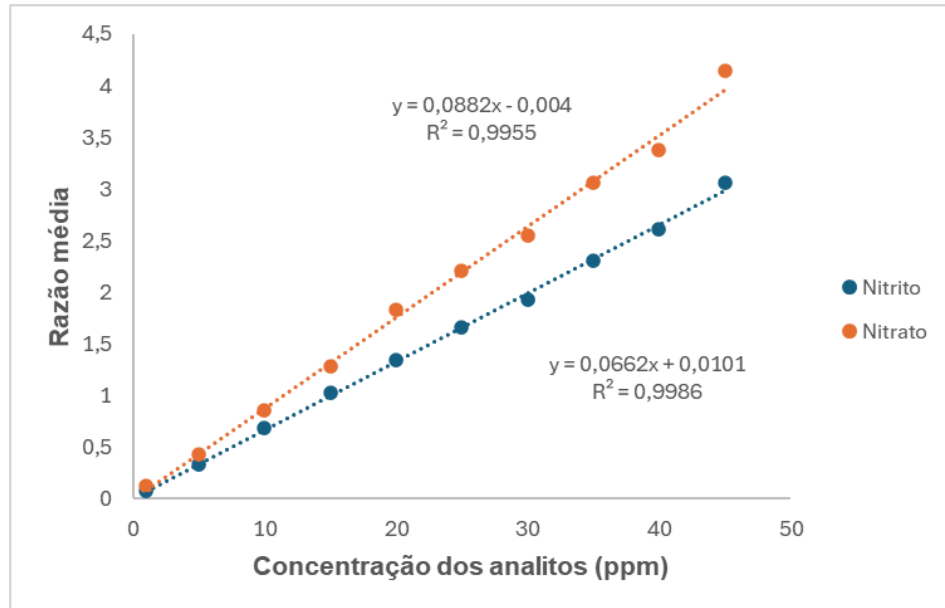
Figura 8. Eletroferograma obtido para NO_3^- e NO_2^- em uma amostra enriquecida com interferentes na concentração de 20 mg L^{-1}



Fonte: Autoria própria (2025)

5.2.2 Linearidade

A linearidade representa a faixa em que as respostas do método são diretamente proporcionais à concentração do método.³² Neste estudo a linearidade foi analisada com base no coeficiente de determinação e correlação obtido por meio da curva analítica de calibração externa em triplicata. A equação obtida foi $Y = 0,0882X - 0,004$, O coeficiente de determinação (R^2) obtido foi de 0,9955 e o coeficiente de correlação (R) de 0,9977 para NO_3^- , enquanto para o NO_2^- a equação da reta foi $Y = 0,0662X + 0,0101$, com (R^2) de 0,9986 e (R) de 0,9993 (figura 9). Ambos os coeficientes demonstram a linearidade do método.

Figura 9. Curva de calibração externa de NO_3^- e NO_2^- pelo método CE.

Fonte: Autoria própria (2025)

5.2.3 Efeito de matriz

Para determinação do efeito de matriz, foi realizada a comparação entre a curva de calibração externa, com a curva por adição de padrão, para verificação de interferências nas respostas dos analitos causadas pela matriz. Para isso, é calculada a razão entre os coeficientes angulares de ambas as curvas, não podendo interferir por mais de 10%. O estudo foi conduzido em duas matrizes distintas, sendo a matriz A o suplemento e a matriz B a beterraba em pó. A tabela abaixo (tabela 1) apresenta os valores encontrados para cada matriz.

Tabela 1. Avaliação do efeito de matriz com base na razão entre as curvas de calibração externa e por adição de padrão para determinação de nitrato e nitrito

	Matriz A		Matriz B	
	NO_3^-	NO_2^-	NO_3^-	NO_2^-
Equação de reta	$Y=0,0884X+1,628$	$Y=0,0669X+0,032$	$Y=0,0814X+0,749$	$Y=0,0665X-0,001$
Razão Coef. Ang	100 %	101%	92%	100%

Fonte: Autoria própria (2025)

Logo, considerando os valores obtidos, é possível assumir que ambas as matrizes não causam interferência na resposta dos analitos.

5.2.4 Limite de Detecção e Quantificação

O limite de detecção indica o menor valor que pode ser identificado com confiança, enquanto o limite de quantificação representa o menor valor que pode ser quantificado.³² A Tabela abaixo (Tabela 2) apresenta os valores encontrados de LOD através da razão entre a altura do sinal e a altura do ruído multiplicados por 3 e os valores de LOQ da mesma razão multiplicado por 10.

Tabela 2. Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos.

Parâmetro	Nitrato	Nitrito
LOD (mg L ⁻¹)	0,021	0,176
LOQ (mg L ⁻¹)	0,071	0,587

Fonte: Autoria própria (2025)

Considerando os valores obtidos, verificou-se que os limites de detecção e quantificação estão adequados, confirmando a aplicabilidade do método para a determinação dos analitos em estudo.

5.2.5 Precisão

Se trata da medida que avalia as incertezas no procedimento experimental, então quanto maior for a precisão, mais confiáveis são os valores obtidos.³² No presente estudo foi realizada a precisão instrumental, precisão intra-dia e inter-dia aferidas em três concentrações diferentes. Os resultados devem conter um coeficiente de variação (CV) menor ou igual a 5,³² portanto os valores estão apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5 demonstrando os resultados para cada ensaio.

Tabela 3. Resultados para a Precisão Instrumental obtida na determinação de nitrato e nitrito por eletroforese capilar

	Matriz A				Matriz B			
	Nitrato		Nitrito		Nitrato		Nitrito	
	t_m	Razão Área NO ₃ ⁻ /PI	t_m	Razão Área NO ₂ ⁻ /PI	t_m	Razão Área NO ₃ ⁻ /PI	t_m	Razão Área NO ₂ ⁻ /PI
5 mg L⁻¹								
Média	0,732	2,086	0,764	0,365	0,738	1,138	0,758	0,333
Desvio padrão	0,002	0,007	0,011	0,001	0,004	0,014	0,002	0,004
CV	0,209	0,319	1,400	0,375	0,548	1,229	0,202	1,087
20 mg L⁻¹								
Média	0,714	3,453	0,742	1,374	0,721	2,487	0,745	1,373
Desvio padrão	0,002	0,013	0,004	0,011	0,001	0,009	0,002	0,022
CV	0,292	0,380	0,510	0,831	0,160	0,368	0,232	1,570
40 mg L⁻¹								
Média	0,708	5,090	0,735	2,659	0,712	3,926	0,736	2,268
Desvio padrão	0,001	0,014	0,001	0,097	0,013	0,005	0,001	0,028
CV	0,163	0,268	0,192	3,658	1,870	0,121	0,136	1,215

* t_m = Tempo de Migração *CV = Coeficiente de Variação *PI = Padrão Interno
 Fonte: Autoria própria (2025).

Tabela 4. Resultados da Precisão Intra-dia obtida na determinação de nitrato e nitrito por eletroforese capilar

	Matriz A				Matriz B			
	Nitrato		Nitrito		Nitrato		Nitrito	
	t_m	Razão Área NO ₃ ⁻ /PI	t_m	Razão Área NO ₂ ⁻ /PI	t_m	Razão Área NO ₃ ⁻ /PI	t_m	Razão Área NO ₂ ⁻ /PI
5 mg L⁻¹								
Média	0,733	2,098	0,766	0,365	0,753	1,222	0,763	0,361
Desvio padrão	0,005	0,060	0,007	0,013	0,013	0,048	0,015	0,018
CV	0,630	2,877	0,869	3,496	1,671	3,942	1,985	5,076
20 mg L⁻¹								
Média	0,725	3,481	0,755	1,393	0,732	2,492	0,766	1,405
Desvio padrão	0,011	0,008	0,013	0,057	0,019	0,115	0,022	0,060
CV	1,536	0,242	1,737	4,111	2,559	4,603	2,888	4,267
40 mg L⁻¹								
Média	0,730	5,096	0,757	2,607	0,732	4,107	0,759	2,486
Desvio padrão	0,014	0,234	0,014	0,119	0,013	0,194	0,015	0,102
CV	1,870	4,590	1,803	4,554	1,708	4,720	1,942	4,115

* t_m = Tempo de Migração *CV = Coeficiente de Variação *PI = Padrão Interno

Fonte: Autoria própria (2025).

Tabela 5. Resultados da Precisão Inter-dia obtida na determinação de nitrato e nitrito por eletroforese capilar

	Matriz A				Matriz B			
	Nitrato		Nitrito		Nitrato		Nitrito	
	t_m	Razão Área NO ₃ ⁻ /PI	t_m	Razão Área NO ₂ ⁻ /PI	t_m	Razão Área NO ₃ ⁻ /PI	t_m	Razão Área NO ₂ ⁻ /PI
5 mg L⁻¹								
Média	0,747	2,149	0,786	0,363	0,758	1,223	0,698	0,331
Desvio padrão	0,017	0,105	0,025	0,011	0,025	0,044	0,013	0,019
CV	2,336	4,895	3,139	2,919	3,244	3,567	1,828	5,672
20 mg L⁻¹								
Média	0,749	3,486	0,787	1,394	0,759	2,501	0,693	1,393
Desvio padrão	0,020	0,031	0,027	0,042	0,018	0,089	0,014	0,069
CV	2,616	0,900	3,397	3,043	2,427	3,540	2,032	4,942
40 mg L⁻¹								
Média	0,744	5,181	0,779	2,662	0,745	4,189	0,686	2,445
Desvio padrão	0,020	0,180	0,027	0,091	0,018	0,137	0,015	0,099
CV	2,649	3,481	3,443	3,420	2,430	3,278	2,206	4,063

* t_m = Tempo de Migração *CV = Coeficiente de Variação *PI = Padrão Interno
Fonte: Autoria própria (2025).

Os valores de Coeficiente de Variação (CV) obtido para ambos os modos de precisão apresentam-se adequados, com valores inferiores a 5%, evidenciando uma boa precisão e confiabilidade do método otimizado.

Para a concentração de 5 mg L⁻¹, o CV apresenta-se ligeiramente acima dos 5%, o que pode ser atribuído à integração manual do pico. Além disso, em baixas concentrações, pequenas variações na área do pico, tendem a resultar em um aumento do valor de CV.

5.2.6 Exatidão

A exatidão corresponde ao grau de concordância entre os valores obtidos pelo método proposto e os valores de referência considerados verdadeiros.³² No presente trabalho a exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão e recuperação. Verifica-se o grau de concordância entre a concentração experimental obtida e a concentração teórica adicionada, cujas resultados de recuperação dos analitos para as amostras estão apresentados na tabela 6

Tabela 6. Valores de recuperação de NO_3^- e NO_2^- por CZE para cada nível de concentração avaliado.

Suplemento			Beterraba em pó		
[] adicionada (mg L ⁻¹)	[] recuperada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	[] adicionada (mg L ⁻¹)	[] recuperada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
NO_3^-			NO_3^-		
5	4,39	87,8	5	5,57	111,4
20	20,04	100,2	20	21,22	106,1
40	38,31	95,8	40	42,00	105,0
NO_2^-			NO_2^-		
5	4,97	99,4	5	5,12	102,4
20	20,32	101,6	20	20,77	103,8
40	38,48	96,2	40	34,23	85,6

Fonte: Autoria própria (2025).

Analisando os valores obtidos, observa-se que os valores obtidos estão adequados para a validação, dentro de uma faixa de 80-120%,³¹ demonstrando boa exatidão do método.

5.2.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio de uma matriz de Youden, na qual sete fatores experimentais foram investigados em dois níveis Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros avaliados para verificação da robustez do método de determinação de nitrato e nitrito por eletroforese capilar

Fator	Nível - (alterado)	Nível + (nominal)
pH BGE	3,89	3,92
Concen Amina	270 mmol	300 mmol
Tensão	- 23 kV	-25 kV
Temperatura	23 °C	25 °C
Pressão	20 mbar	25 mbar
Comprimento	30 cm	32 cm
Injeção	7 seg	8 seg

Fonte: Autoria própria (2025).

As combinações experimentais foram realizadas de acordo com o delineamento proposto, e os resultados obtidos para a variável resposta foram utilizados para cálculo dos efeitos principais de cada fator conforme a equação 2 . Onde Y_+ e Y_- correspondem às médias dos resultados obtidos nos níveis altos (+) e baixos (-), respectivamente.

$$E = \frac{Y_+ - Y_-}{2} \quad (\text{equação 2})$$

Além da estimativa, foi aplicado o teste F de variância com 95% de confiança, a fim de verificar se as variações resultam em diferenças estatisticamente significativas. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 8 para a área dos analitos e a Tabela 9 para o tempo de migração dos analitos.

Tabela 8. Avaliação da robustez do método em relação à área do pico dos analitos.

	Fator	Efeito	F_{Crítico} (95%)	F_{calculado}	Interpretação
NO₃⁻	pH BGE	0,203	9,552	0,277	Não Significativo
	Concen Amina	-0,274	9,552	0,171	Não Significativo
	Tensão	-0,221	9,552	0,508	Não Significativo
	Temperatura	-0,036	9,552	0,586	Não Significativo
	Pressão	0,064	9,552	0,754	Não Significativo
	Comprimento	-0,168	9,552	0,217	Não Significativo
	Injeção	-0,138	9,552	0,239	Não Significativo
NO₂⁻	pH BGE	0,133	9,552	0,055	Não Significativo
	Concen Amina	-0,241	9,552	1,686	Não Significativo
	Tensão	-0,043	9,552	5,342	Não Significativo
	Temperatura	0,079	9,552	0,695	Não Significativo
	Pressão	0,029	9,552	0,266	Não Significativo
	Comprimento	-0,613	9,552	0,323	Não Significativo
	Injeção	-0,074	9,552	1,738	Não Significativo

Fonte: Autoria própria (2025).

Tabela 9. Avaliação da robustez do método em relação ao tempo de migração dos analitos.

	Fator	Efeito	F_{Crítico} (95%)	F_{calculado}	Interpretação
NO₃⁻	pH BGE	0,086	9,552	0,085	Não Significativo
	Concen Amina	-0,094	9,552	0,068	Não Significativo
	Tensão	-0,174	9,552	0,022	Não Significativo
	Temperatura	0,032	9,552	0,032	Não Significativo
	Pressão	0,148	9,552	0,029	Não Significativo
	Compriment o	0,626	9,552	0,002	Não Significativo
	Injeção	-0,116	9,552	0,050	Não Significativo
NO₂⁻	pH BGE	0,063	9,552	0,187	Não Significativo
	Concen Amina	-0,113	9,552	0,060	Não Significativo
	Tensão	-0,192	9,552	0,024	Não Significativo
	Temperatura	0,037	9,552	0,027	Não Significativo
	Pressão	0,159	9,552	0,029	Não Significativo
	Compriment o	0,649	9,552	0,002	Não Significativo
	Injeção	-0,129	9,552	0,049	Não Significativo

Fonte: Autoria própria (2025).

Os resultados observados demonstram que para ambas as variáveis, os valores de $F_{\text{calculado}}$ permaneceram inferiores ao $F_{\text{crítico}}$ (95% de confiança), indicando que as pequenas variações nos parâmetros experimentais não exercem efeito estatisticamente significativo. Dessa forma o método se mostrou robusto tanto em termos de reprodutibilidade instrumental quanto de resposta analítica.

5.3 Determinação de nitrato e nitrito nas amostras

A determinação dos analitos em diferentes amostras foi avaliada por meio por meio da curva de calibração externa, com os valores expressados na tabela 9

Tabela 10. Resultados experimentais obtidos pelo método desenvolvido para quantificação de nitrato e nitrito em suplementos alimentares e vegetal.

Amostra	Teor de NO₃⁻ mg/Kg	Teor de NO₂⁻ mg/Kg
Suplemento em Gel	16.590 ± 0,5	< LOD
Suplemento em Pó	19.050 ± 0,2	< LOD
Beterraba em Pó	14.830 ± 0,2	< LOD
Beterraba In Natura	1.130 ± 0,1	< LOD

Fonte: Autoria própria (2025).

A determinação das amostras revelou a presença de NO₃⁻ em todas as formulações avaliadas, enquanto o NO₂⁻ não foi detectado.

Em algumas amostras, observou-se que o nitrato estava presente de forma isolada intencionalmente, nesses casos não era esperado a presença de nitrito, uma vez que esse ânion não compõem a formulação original nem é formado durante o preparo das amostras. Em matrizes vegetais, a concentração de nitrito costuma ser inferior a de nitrato, podendo estar situada abaixo do LOD do método.

Esses resultados estão em concordância com a literatura que descreve o nitrato como a principal espécie nitrogenada em vegetais, enquanto o nitrito ocorre apenas em baixas concentrações.³⁴ Dessa forma, o método demonstrou-se seletivo e adequado para a determinação de nitrato, permitindo sua quantificação confiável nas amostras analisadas.

5.4 Comparação com outros métodos da literatura

O método mais comumente empregado para a determinação de nitrato e nitrito é o método espectrofotométrico, que apresente limites de detecção bastante baixos, da ordem de 0,00049 mg L⁻¹ (NERDY et al., 2018)³⁵ e é amplamente utilizado devido à sua simplicidade, disponibilidade e baixo custo. No entanto, este método envolve reações químicas sucessivas e etapas de derivatização, demandando tempo considerável de preparo e amostra e consumo elevado reagentes, o que o torna pouco alinhado com os princípios da química verde.

Outros métodos descritos na literatura incluem o uso de HPLC, que apresenta limites de quantificação de 0,46 mg L⁻¹ (BAIÃO et., 2015),³⁶ no entanto o método

desenvolvido neste trabalho apresenta limite de quantificação ainda mais baixo, além de dispensar o uso de solventes orgânicos, colunas específicas, resultando em menor custo e tempo de preparo por amostra analisada.

Em contrapartida, o método desenvolvido por CZE apresentou limites de quantificação de 0,176 mg L⁻¹ para NO₂⁻ e 0,021 mg L⁻¹ para NO₃⁻, sendo mais sensível que outros métodos de CZE reportados na literatura, que apresentaram valores de 0,021 mg L⁻¹ e 0,028 mg L⁻¹ (APPRATO et al., 2023)³⁷ respectivamente. Além disso, o método proposto dispensa qualquer preparo amostral complexo, consome quantidades mínimas de reagentes e possibilita a determinação simultânea de ambos os ânions em um tempo médio de apenas 5 minutos por corrida eletroforética.

Portanto, o método proposto mostrou-se adequado e eficiente para determinação de NO₂⁻ e NO₃⁻ em amostras reais, conciliando boa sensibilidade, rapidez e caráter ambientalmente sustentável, destacando-se como uma alternativa mais verde e prática frente às técnicas espectrofotométricas e cromatográficas convencionais.

6 Conclusão

Ao longo do desenvolvimento do presente trabalho, foi possível demonstrar a eficácia do método proposto para determinar nitrato e nitrito em diferentes fontes de suplementação tendo como base a beterraba. O software PeakMaster® demonstrou ser fundamental para definir os componentes do eletrólito e simular as condições do método, reduzindo o tempo de otimização e consumo de reagentes. A boa concordância entre o eletroferograma simulado e experimental confirmou a aplicabilidade da simulação como etapa preliminar de ajuste de método.

A validação foi conduzida de acordo com a RDC nº 166 da ANVISA, de 2017, contemplando parâmetros como seletividade, precisão, exatidão, robustez, além de limites de detecção e quantificação adequados. Esses resultados confirmam a confiabilidade e reprodutibilidade do método.

As determinações realizadas indicaram a presença de nitrato nas amostras avaliadas, com variação entre os diferentes tipos de suplementos. Essa diferença pode estar relacionada tanto ao processo industrial, quanto a fatores naturais da

matéria-prima, como tipo de solo, luminosidade e condições de cultivo. Por outro lado o nitrito não foi detectado, o que já era esperado, uma vez que esse composto é instável e tende a se converter rapidamente em outras formas nitrogenadas, especialmente em matrizes de vegetais processados.

Comparado com métodos tradicionais descritos na literatura, o método desenvolvido mostrou vantagens importantes, como menor tempo de análise, consumo reduzido de reagentes, dispensa de preparo complexo e capacidade simultânea de nitrato e nitrito. Além de apresentar limites de quantificação compatíveis ou superiores de outros métodos.

O método desenvolvido mostrou-se simples, rápido e com baixo consumo de reagente, alinhando-se aos princípios da química verde. Sua aplicação em rotinas de controle é viável, podendo também ser útil em estudos que buscam correlacionar o teor de nitrato presente em suplementos e seus possíveis efeitos fisiológicos. De modo geral, o método atingiu os objetivos propostos, demonstrando boa performance analítica, aplicabilidade prática e potencial para ser aplicado em pesquisas futuras voltadas à padronização e avaliação de produtos de origem vegetal.

7 Referências

- ¹ HONIKEL, Karl-Otto. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, [S.L.], v. 78, n. 1-2, p. 68-76, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.030>.
- ² ZHONG, Liezhou; BLEKKENHORST, Lauren C.; BONDONNO, Nicola P.; SIM, Marc; WOODMAN, Richard J.; CROFT, Kevin D.; LEWIS, Joshua R.; HODGSON, Jonathan M.; BONDONNO, Catherine P. A food composition database for assessing nitrate intake from plant-based foods. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 394, p. 133411, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133411>.
- ³ ARAZI, H.; EGHBALI, E. Possible Effects of Beetroot Supplementation on Physical Performance Through Metabolic, Neuroendocrine, and Antioxidant Mechanisms: A Narrative Review of the Literature. *Frontiers in Nutrition*, v. 8, art. 660150, 2021. *Frontiers in Nutrition*. [10.3389/fnut.2021.660150](https://doi.org/10.3389/fnut.2021.660150)
- ⁴ AMANCIO, I. C. P.; DIAS, I. A. P.; COUTO, E. M.; ABREU, W. C. DE. Suplementação de nitrato e desempenho esportivo: uma revisão narrativa. *RBPFEEX - Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício*, v. 19, n. 119, p. 110-123, mar 2025.
- ⁵ IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book*. 2nd ed. Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. Disponível em: <https://goldbook.iupac.org>. Acesso em: 3 nov. 2025.
- ⁶ EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Nitrates and nitrites added to food. *EFSA Journal*, v. 12, n. 6, p. 1–10, 2014.
- ⁷ JOHNSON, Sarah Fossen. Methemoglobinemia: infants at risk. **Current Problems In Pediatric And Adolescent Health Care**, [S.L.], v. 49, n. 3, p. 57-67, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cppeds.2019.03.002>.
- ⁸ SHIVA, Sruti; WANG, Xunde; A RINGWOOD, Lorna; XU, Xueying; YUDITSKAYA, Susan; ANNAVAJJHALA, Vidhya; MIYAJIMA, Hiroaki; HOGG, Neil; HARRIS, Zena Leah; GLADWIN, Mark T. Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis. **Nature Chemical Biology**, [S.L.], v. 2, n. 9, p. 486-493, 13 ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio813>.
- ⁹ KARWOWSKA, Małgorzata; KONONIUK, Anna. Nitrates/Nitrites in Food—Risk for Nitrosative Stress and Benefits. **Antioxidants**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 241, 16 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9030241>.
- ¹⁰ MAPA. Instrução Normativa nº 51/2006. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-272-de-14-de-marco-de-2019-84556685>. Acesso em: 11 julho. 2025.

- ¹¹ OLIVEIRA, E. M. D. Nitrato, nitrito e sorbato em produtos cárneos consumidos no Brasil. 2014. 40 f. TCC (Monografia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Estado de São Paulo, 2014.
- ¹² DUTRA, Camila Braga; RATH, Susanne; REYES, Felix Guillermo. Nitrosaminas voláteis em alimentos. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, v. 18, n. 1, p. 111–120, jan./mar. 2007
- ¹³ SONG, Peng; WU, Lei; GUAN, Wenxian. Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: a meta-analysis. *Nutrients*, [S.L.], v. 7, n. 12, p. 9872-9895, 1 dez. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu7125505>.
- ¹⁴ SEYYEDSALEHI, Monireh Sadat; MOHEBBI, Elham; TO URANG, Fatemeh; SASANFAR, Bahareh; BOFFETTA, Paolo; ZENDEHDEL, Kazem. Association of Dietary Nitrate, Nitrite, and N-Nitroso Compounds Intake and Gastrointestinal Cancers: a systematic review and meta-analysis. *Toxics*, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 190, 17 fev. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxics11020190>.
- ¹⁵ JONES, Andrew M.; THOMPSON, Christopher; WYLIE, Lee J.; VANHATALO, Anni. Dietary Nitrate and Physical Performance. *Annual Review Of Nutrition*, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 303-328, 21 ago. 2018. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117-051622>.
- ¹⁶ DOMÍNGUEZ, Raúl et al. Effects of Beetroot Juice Supplementation on Cardiorespiratory Endurance in Athletes. A Systematic Review. *Nutrients*, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 43, 6 jan. 2017.
- ¹⁷ GILL, A.; ZAJDA, J.; MEYERHOFF, M. E. Comparison of electrochemical nitric oxide detection methods with chemiluminescence for measuring nitrite concentration in food samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 1077, p. 167–173, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.065>
- ¹⁸ NAKASHIMA, Yasuo; SUZUKI, Seiichi; YAMAZAKI, Makiko; INOUE, Yoshinori; FUKATSU, Yuta; YAMAMOTO, Atsushi. Determination of Nitrite and Nitrate in Meat Products by Inline Dialysis Ion Chromatography. *Bunseki Kagaku*, [S.L.], v. 59, n. 8, p. 679-683, 2010. Japan Society for Analytical Chemistry. <http://dx.doi.org/10.2116/bunsekikagaku.59.679>
- ¹⁹ VASCO, Elsa; DIAS, M. Graça; OLIVEIRA, Luísa. The first harmonised total diet study in Portugal: nitrate occurrence and exposure assessment. *Food Chemistry*, [S.L.], v. 392, p. 133152, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133152>.
- ²⁰ TEMBO, Zebron Nchimunya; AYGUN, Fatma Şeker; ERDOĞAN, Behice Yavuz. Simultaneous determination of nitrate, nitrite and bromate by capillary zone electrophoresis in tea infusions grown in the Black Sea region of Turkey. *Separation Science Plus*, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 45-53, 12 nov. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/sscp.202000074>

- ²¹ ANDRADE, Raquel; VIANA, Claudia O; GUADAGNIN, Silvane G; REYES, Felix G.R; RATH, Susanne. A flow-injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide generation. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 80, n. 4, p. 597-602, abr. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146\(02\)00508-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146(02)00508-3).
- ²² MUMTARIN, Z. et al. Electro-kinetics of conversion of NO₃⁻ into NO₂⁻ and sensing of nitrate ions via reduction reactions at copper immobilized platinum surface in the neutral medium. *Electrochimica Acta*, v. 346, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.elec-tacta.2020.135994>
- ²³ GUO, Yu-Xian; ZHANG, Qing-Feng; SHANGGUANG, Xincheng; ZHEN, Guodong. Spectrofluorimetric determination of trace nitrite with o-phenylenediamine enhanced by hydroxypropyl-β-cyclodextrin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, [S.L.], v. 101, p. 107-111, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.083>
- ²⁴ TAVARES, M. F. M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. *Química Nova*, v. 20, p. 493, 1997
- ²⁵ MARTÍNKOVÁ, Eva; KŘŽEK, Tomáš; COUFAL, Pavel. Determination of nitrites and nitrates in drinking water using capillary electrophoresis. **Chemical Papers**, [S.L.], v. 68, n. 8, p. 1008-1014, 1 jan. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2478/s11696-014-0548-4>.
- ²⁶ PAVARINI, Daniel & SILVA, Denise & LOPES, João & LOPES, Norberto. (2011). *Substâncias Voláteis: Técnicas de Extrações das Clássicas às Avançadas*.
- ²⁷ SKOOG, D. A. et al. *Princípios de Análise Instrumental*. 7. ed. Cidade do México: Cengage Learning, 2018.
- ²⁸ SPUDEIT, Daniel Alfonso; DOLZAN, Maressa Danielli; MICKE, Gustavo Amadeu. Eletroforese Capilar: uma breve introdução. **Scientia Chromatographica**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 287-297, 2012. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.017>.
- ²⁹ 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*. 27. 10.5935/0103-5053.20160087
- ³⁰ MARCHI, Giuliano et al. Princípios da determinação de íons em amostras ambientais por eletroforese capilar. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 76 p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/571969> . Acesso em: 12 agosto. 2025.
- ³¹ VITALI, Luciano; et al. New multilayer coating using quaternary ammonium chitosan and κ-carrageenan in capillary electrophoresis: application in fast analysis of betaine and methionine. **Talanta**, [S.L.], v. 123, p. 45-53, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.047>.

- ³² Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 166. 2017. Disponível em: < https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412 > . Acesso em: 01 de Agosto de 2025.
- ³³ Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos; DOQ-CGCRE-008, Revisão: 01 de março de 2003.
- ³⁴ BRZEZIŃSKA-ROJEK, Joanna; SAGATOVYCH, Svitlana; MALINOWSKA, Paulina; GADAJ, Kamila; PROKOPOWICZ, Magdalena; GREMBECKA, Małgorzata. Antioxidant Capacity, Nitrite and Nitrate Content in Beetroot-Based Dietary Supplements. **Foods**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 1017, 27 fev. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods12051017>
- ³⁵ NERDY, Nerdy; PUTRA, Effendy de Lux. Spectrophotometric Method for Determination of Nitrite and Nitrate Levels in Broccoli and Cauliflower with Different Fertilization Treatment. *Oriental Journal Of Chemistry*, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 2983-2991, 13 nov. 2018. Oriental Scientific Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/340639>.
- ³⁶ BAIÃO, Diego dos Santos; CONTE-JUNIOR, Carlos Adam; PASCHOALIN, Vânia Margaret Flosi; ALVARES, Thiago Silveira. Quantitative and Comparative Contents of Nitrate and Nitrite in *Beta vulgaris* L. by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescence. **Food Analytical Methods**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 1002-1008, 14 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-015-0275-7>.
- ³⁷ APPRATO, Giulia; D'AGOSTINI, Giulia; ROSSETTI, Paolo; ERMONDI, Giuseppe; CARON, Giulia. In Silico Tools to Extract the Drug Design Information Content of Degradation Data: the case of protacs targeting the androgen receptor. **Molecules**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 1206, 26 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules2803120> .