

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS

FABIANA RIBEIRO DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
NITRITO E NITRATO EM AMOSTRAS DE SORO LÁCTEO POR ELETROFORESE
CAPILAR**

**Juiz de Fora
2014**

FABIANA RIBEIRO DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
NITRITO E NITRATO EM AMOSTRAS DE SORO LÁCTEO POR ELETROFORESE
CAPILAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Novos Produtos e Processos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. DSc. Marccone Augusto Leal de Oliveira

Co-orientador: DSc. Fernando Antonio Simas Vaz

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Fabiana Ribeiro dos.

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE NITRITO E NITRATO EM AMOSTRAS DE SORO LÁCTEO POR ELETROFORESE CAPILAR / Fabiana Ribeiro dos Santos. -- 2014. 86 p.

Orientador: Marccone Augusto Leal de Oliveira

Coorientador: Fernando Antonio Simas Vaz

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2014.

1. Soro Lácteo. 2. Nitrito. 3. Nitrato. 4. Eletroforese Capilar. I. Oliveira, Marccone Augusto Leal de, orient. II. Vaz, Fernando Antonio Simas, coorient. III. Título.

FABIANA RIBEIRO DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
NITRITO E NITRATO EM AMOSTRAS DE SORO LÁCTEO POR ELETROFORESE
CAPILAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Novos Produtos e Processos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Dissertação aprovada em: 30/05/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA

Prof^a. Dr^a. Sandra Maria Pinto - UFLA

Prof^a. Dr^a. Renata Golin Bueno Costa - EPAMIG - ILCT

Prof. Dr. Marccone Augusto Leal De Oliveira - UFJF

*Dedico este trabalho aos que possam compreender
sobre a importância de se planejar e de se dispor
contingências por um mundo melhor e assim
o façam, sempre que possível.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira, pela orientação, pelo incentivo, dedicação e paciência constantes, pela amizade e carinho, por acreditar em meu potencial, pela oportunidade ímpar de aprender com o seu conhecimento e é claro pelo sorriso e braços abertos que me recebeu em seu grupo de pesquisa.

Ao Dr. Fernando Antonio Simas Vaz, pela co-orientação, amizade, paciência e todo conhecimento despendidos a este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Renata Golin Bueno Costa, ao Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu e à Prof^a. Dr^a. Sandra Maria Pinto, por terem gentilmente aceitado fazer parte da banca avaliadora e por terem despendido todo o conhecimento em prol do aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ), com os quais eu tenho o privilégio de aprender diariamente e aquilatar meu espírito, eu amo vocês.

Ao Departamento de Química da UFJF por todo apoio e estrutura despendidos.

Ao Instituto de Laticínios Candido Tostes por gentilmente ceder as amostras para a conclusão deste trabalho.

À EMBRAPA Gado de Leite, à GEMACON TECH e ao Laticínio Coalhadas, pela colaboração e parceria na conclusão deste trabalho.

Aos órgãos de fomento, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Guilherme Nunes de Souza por ter desistido, no último instante, de ser o meu orientador, essa decisão me fez alçar voos em outras direções, conhecer pessoas maravilhosas e provar que Deus nunca pisca.

À Danielle Lourenço (Secretária do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados – UFJF) pelo carinho, paciência, dedicação e competência constantes.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Furtado pelo apoio e carinho.

Ao corpo docente do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados – UFJF, pelo vasto conhecimento, paciência e carinho despendidos.

Aos amigos que me motivaram nesta longa jornada (é claro que as festinhas e os churrascos ajudaram bastante).

Aos que me fizeram sorrir, aos que acreditaram, aos que torceram e remaram juntos, aos que fizeram a diferença e aos que, acima de tudo, conquistaram o meu coração.

Ao meu amado marido, Delamare Queiroz, por ter compreendido minhas ausências, por trazer luz a minha vida e por me apoiar quando tudo parecia desabar. Eu amo você!

Aos meus pais e irmãos, pelas orações e pensamentos positivos para que eu pudesse alcançar os meus objetivos. Eu amo vocês!

À minha linda sobrinha, Emanuely, por me fazer sempre sorrir, mesmo nos dias de desespero.

A todos aqueles, que de alguma forma, contribuíram para o meu desenvolvimento profissional/acadêmico.

Aos que já se foram para o infinito e além, saudades eternas.

Às pequenas Jessie e Nina, por tornarem a minha vida mais leve e feliz, e por todo o amor felino e incondicional.

Aos meus guias espirituais, timoneiros da minha missão.

A Deus, por arquitetar um Universo maravilhoso e por permitir que todos vocês existam e dividam uma espécie, uma época e um planeta comigo.

Muito Obrigada!!!

“A educação é arma mais poderosa para mudar o mundo”

(Nelson Mandela)

“Seja a mudança que você quer ver no mundo.”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

O soro lácteo é a porção aquosa liberada do coágulo durante a fabricação de queijos, sendo considerado tanto um efluente residual quanto um subproduto de alto valor biológico. O seu reaproveitamento é estudado e sugerido para melhorar a eficiência econômica dos laticínios e minimizar os impactos ambientais. Porém, a adição de NaNO_3 ou KNO_3 ao leite destinado a produção de queijos (exceto os frescos), tem preocupado especialistas, uma vez que o NO_3^- ingerido pode ser reduzido a NO_2^- no organismo humano, podendo tanto se ligar à aminas e amidas e formar compostos N-nitrosos como as nitrosaminas que, sob certas condições de exposição, são agentes potencialmente mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, quanto se ligar à hemoglobina e causar metahemoglobinemia. Como, em média, 70% do NO_3^- adicionado ao leite é arrastado pelo soro lácteo e este é utilizado como matéria prima na indústria de laticínios, a determinação destes íons é de suma importância. Contudo, a metodologia oficial geralmente empregada, apresenta algumas desvantagens como a baixa frequência analítica (2 amostras por hora), necessidade de empregar colunas de cádmio bem como a sua regeneração, o descarte dos resíduos resultantes da regeneração, pré-tratamento das amostras e, além de ser um método laborioso, requer a utilização de diversos reagentes e expõe o analista a possíveis riscos para a saúde. Assim, um método alternativo para a determinação simultânea de nitrito e nitrato por eletroforese capilar de zona (CZE), com detecção indireta no UV em 210 nm e tempo de análise em torno de 3 minutos é proposto. O eletrólito de corrida otimizado consiste de 100 mmol L⁻¹ de TRIS, 50 mmol L⁻¹ de HCl e 0,150 mmol L⁻¹ de CTAB com pH 8.2. Os resultados alcançados foram satisfatórios, indicando que o método otimizado por CZE pode ser usado para a determinação simultânea dos íons de nitrito e nitrato em amostras de soro lácteo, apresentando como vantagens: menor tempo de análise, simples preparo de amostras e baixo custo.

Palavras-chaves: Soro lácteo. Nitrato. Nitrito. Eletroforese Capilar.

Abstract

The whey is the aqueous portion of the coagulum liberated during cheese making and is considered both a residual effluent as a byproduct of high biological value. Its reuse is studied and suggested for improve the economic efficiency of dairy and minimize environmental impacts. However, the addition of NaNO_3 or KNO_3 at the milk for cheese production (except fresh) has specialists concerned, since it can be ingested NO_3^- reduced to NO_2^- in the human organism can both bind to form amides and amines, and N-nitroso compounds such as nitrosamines that under certain exposure conditions, are potentially mutagenic, carcinogenic and teratogenic agents as binding to hemoglobin and cause methemoglobinemia. As, on average, 70% of the NO_3^- added to milk is dragged by whey and this is used as raw material in the dairy industry, the determination of these ions is of paramount importance. Nevertheless, the official method generally used, has some disadvantages such as low analytical frequency (2 samples per hour), need to employ columns of cadmium and its regeneration, disposal of waste resulting from regeneration, pre-treatment of samples and addition to being a laborious method requires the use of various reagents and exposes the analyst to potential health risks. So an alternative method for the simultaneous determination of nitrite and nitrate by capillary zone electrophoresis (CZE), with indirect UV detection at 210 nm analysis time of about 3 minutes is proposed. The optimized electrolyte consists of 100 mmol L^{-1} TRIS, 50 mmol L^{-1} HCl and $0.150 \text{ mmol L}^{-1}$ of CTAB at pH 8.2. The results achieved were satisfactory, indicating that the optimized CZE method can be used for simultaneous determination of nitrite and nitrate ions in samples of whey, presenting advantages: shorter time of analysis, simple sample preparation and low cost.

Keywords: Whey. Nitrate. Nitrite. Capillary Electrophoresis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Evolução da produção de leite.....	21
Figura 2	Produção de queijo no Brasil por tipo de produto.....	23
Figura 3	Queijo Emmental com olhaduras grandes e irregulares, caracterizando o estufamento tardio.....	24
Figura 4	Queijo prato bola com olhaduras grandes e irregulares, caracterizando o estufamento tardio.....	24
Figura 5	Reaproveitamento do soro lácteo.....	30
Figura 6	Diagrama esquemático de um equipamento de eletroforese capilar.....	40
Figura 7	Representação esquemática do fluxo eletrosmótico.....	43
Figura 8	Perfil de fluxo gerado por pressão (A) e o fluxo eletrosmótico (B).	44
Figura 9	Representação esquemática dos modos de operação em eletroforese capilar. A) contra-eletrosmótico; B) co-eletrosmótico.	45
Figura 10	Representação esquemática do fluxo eletrosmótico invertido.....	46
Figura 11	Eletroferogramas A e B correspondem à amostras sem padrão e amostras + padrão, respectivamente.....	57
Figura 12	Eletroferograma de simulação de eletrólito de corrida TRIS/HCl em ACN/Metanol (1 :1).....	58
Figura 13	Eletroferograma TRIS/HCl em ACN/Metanol (1 :1).....	58
Figura 14	Eletroferograma de simulação de eletrólito de corrida com HIBA..	59
Figura 15	Eletroferograma HIBA.....	59
Figura 16	Eletroferograma de simulação de eletrólito de corrida com ácido ftálico	60
Figura 17	Eletroferograma ácido ftálico.....	60
Figura 18	Eletroferogramas de padrões e amostra de soro lácteo com padrão nas concentrações 0,1; 1,0 e 10 mg/L de padrões NO_2^- e NO_3^-	61
Figura 19	Comparação entre a curva de adição de padrão e a curva de calibração externa.....	62
Figura 20	Eletroferograma de amostra de soro lácteo fortificada com 20 mg/L de padrões NO_2^- e NO_3^-	68
Figura 21	Eletroferogramas de amostra de soro lácteo.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição do leite e dos soros doce e ácido.....	27
Tabela 2	Composição mineral dos soros doce e ácido.....	28
Tabela 3	Metodologias alternativas para determinação de NO_2^- e NO_3^- em diversas matrizes.....	37
Tabela 4	Esquema de preparo e diluição das amostras e padrões de NO_2^- e NO_3^-	50
Tabela 5	Procedimento para condicionamento do capilar novo (nunca usado).....	50
Tabela 6	Procedimento para pré-condicionamento diário do capilar.....	51
Tabela 7	Esquema de preparo e diluição das amostras, utilizando Bórax.....	56
Tabela 8	Desvio padrão (s) e coeficiente de variação (CV) obtidos após 30 (trinta) análises de uma mesma amostra de soro lácteo.....	65
Tabela 9	Resultados da exatidão e precisão do método, expressos em limite de repetitividade média, recuperação, LD e LQ.....	66
Tabela 10	Porcentagens de recuperação (% R), desvio padrão (s) e coeficientes de variação (CV) obtidos após 30 (trinta) análises em amostras de soro lácteo.....	66
Tabela 11	Resultados das concentrações de NO_2^- e NO_3^- presentes nas 13 (treze) diferentes amostras analisadas, quantidade adicionada ao leite e a % de NO_3^- arrastada para o soro lácteo.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
CGE	<i>Capillary Gel Electrophoresis</i>
CIEF	<i>Capillary Isoelectric Focusing</i>
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
CITP	<i>Capillary Isotachophoresis</i>
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DAD	Detector de Arranjos de Diodos
EC	Eletroforese Capilar
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FEO	Fluxo Eletrosmótico
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ O	Água
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
Kg	Quilograma
KNO ₃	Nitrato de Potássio
kV	Kilovolts
LD	Limite de Detecção
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MECK	<i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i>
Mg	Miligramas
Mmol	Milimol
mL	Mililitros
m/v	Massa Volume
NaOH	Hidróxido de Sódio
NARS	Nitrato redutases
Nm	Nanômetro
nL	Nanolitros
NO ₂ ⁻	Íon Nitrito
NO ₃ ⁻	Íon Nitrato
NaNO ₃	Nitrato de Sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
pKa	Constante de Acidez
µg	Microgramas
µA	MicroAmper
R.P.M.	Rotações por Minuto
SiOH	Grupos Silanóis
TRIS	Trismetilaminometano

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
US\$	Dólar
ζ	Potencial Zeta
μe	Mobilidade Eletroforética
q	Carga
η	Viscosidade do Meio
r	Raio Hidratado
$v e$	Velocidades Eletroforéticas
π	Pi = 3,1416
E	Campo Elétrico
Σ	Somatório
$\mu e f$	Mobilidade Efetiva
α	Distribuição das Espécies
+	Positivo
-	Negativo
ϵ_0	Permissividade do Vácuo
ϵ	Constante Dielétrica
$v o s m$	Velocidade do Fluxo Eletrosmótico
$\mu o s m$	Mobilidade de Fluxo Eletrosmótico
°C	Graus Celsius
®	Marca Registrada
©	Direitos Autorais
mAu	Mili unidades Arbitrárias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 O LEITE.....	19
2.1.1 A produção de leite.....	20
2.2 O QUEIJO.....	21
2.2.1 A história do queijo.....	22
2.2.1.1 A produção de queijo.....	23
2.2.2 O estufamento tardio.....	23
2.2.3 Aminas biogênicas.....	26
2.3 O SORO LÁCTEO.....	26
2.3.1 Composição química.....	27
2.3.2 Impacto ambiental.....	28
2.3.3 Benefícios à saúde.....	28
2.3.4 Utilização do soro em derivados lácteos e suas aplicações na indústria de alimentos.....	29
2.4 NITRITO (NO_2^-) E NITRATO (NO_3^-).....	31
2.4.1 Ocorrência em alimentos.....	31
2.4.2 Aspectos toxicológicos.....	33
2.4.3 Aspectos da legislação.....	35
2.4.4 Aspectos analíticos na determinação de nitrito e nitrato.....	36
2.4.4.1 Metodologia oficial.....	36
2.4.4.2 Metodologias alternativas.....	37
2.5 ELETROFORESE CAPILAR (EC).....	38
2.5.1 Conceito.....	38
2.5.2 Histórico.....	38
2.5.3 Eletroforese capilar de zona.....	39
2.5.4 Instrumentação.....	39
2.5.4.1 Introdução da amostra.....	41
2.5.4.2 Sistemas de detecção.....	41
2.5.5 Fundamentação teórica.....	42
2.5.6 Aditivos.....	45

3 OBJETIVOS	47
3.1 GERAL.....	47
3.2 ESPECÍFICOS.....	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	48
4.2 INSTRUMENTAÇÃO.....	48
4.3 AMOSTRAS.....	49
4.3.1 Coleta das amostras.....	49
4.3.2 Preparo das amostras.....	49
4.4 PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	50
4.5 <i>SOFTWARES</i>	51
4.6 ESTUDO DA LINEARIDADE.....	51
4.6.1 Avaliação do efeito de matriz na porcentagem de recuperação dos analitos.....	52
4.6.2 Verificação da falta de ajuste.....	53
4.7 FIGURAS DE MÉRITO.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 TESTES PRELIMINARES.....	56
5.1.1 Testes com tetraborato de sódio (Bórax).....	56
5.1.2 Testes com centrifugação, diluição e filtragem.....	57
5.1.3 Testes com outros eletrólitos de corrida.....	57
5.2 RESULTADOS OTIMIZADOS.....	60
5.3 ESTUDO DA LINEARIDADE.....	62
5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ – SELETIVIDADE.....	63
5.4.1 Condições de contorno – “Curva de dois pontos”.....	63
5.5 VERIFICAÇÃO DA FALTA DE AJUSTE.....	64
5.6 FIGURAS DE MÉRITO.....	65
5.6.1 Precisão (repetitividade), LD e LQ.....	65
5.6.2 Exatidão (recuperação).....	66
5.7 RESULTADO DAS AMOSTRAS.....	67
6 CONCLUSÃO	70
7 PERSPECTIVAS	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1 INTRODUÇÃO

A população mundial cresce a uma taxa de 83 milhões de pessoas por ano. Assim em 2050, o planeta abrigará cerca de 9 bilhões de habitantes, com a necessidade do aumento da disponibilidade de produtos alimentares que supram as carências nutricionais dos indivíduos (KINKARTZ, 2013). Neste contexto, a busca pela segurança alimentar, com foco no alimento seguro e na produção sustentável tem se tornado a tendência deste novo milênio.

Com a produção em ascensão e ocupando o quinto lugar mundial em produção leiteira, o Brasil atingiu a marca de 35 bilhões de litros de leite em 2013, 35% a mais que os 26 bilhões de litros contabilizados em 2007 (ABIQ, 2014). Projeções apontam que 37 bilhões de litros de leite serão produzidos no país até o final deste ano (ABIQ, 2014). Acompanhando esta curva crescente está a produção de queijos que em 2011 foi de 867,1 mil toneladas, um aumento de 9,4% em relação a 2010 e especialistas do setor estimam que nos próximos anos, a produção nacional sob inspeção, ultrapassará 1 milhão de toneladas de queijo (ABIQ, 2014). O Brasil entre 2000 e 2008, apresentou um aumento de 30,8% no consumo *per capita* de queijo, não obstante, ocupou o terceiro lugar na classificação mundial de produção queijos (CARTA LEITE, 2010).

Diante deste cenário cercado de indicadores positivos na cadeia láctea e com aproximadamente 25% da produção de leite sendo destinada a produção de queijos (ABIQ, 2014), as indústrias de laticínios vêm enfrentando um grande desafio: o soro lácteo, porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação convencional de queijos ou da caseína. Versando em cerca de 80-90% do volume de leite utilizado para a produção de queijo, o soro contém cerca de 50% dos nutrientes do leite que o originou, tais como: proteínas solúveis, lactose, vitamina e minerais (DAIRY PROCESSING HANDBOOK, 1995).

No Brasil, durante muito tempo, o soro lácteo foi utilizado na alimentação animal ou lançado em rios, desrespeitando a legislação ambiental vigente (PORTO et al., 2005; NEVES, 2001). Atualmente, o soro gerado é aproveitado pelas indústrias de laticínios, principalmente na fabricação de ricota, na produção de bebidas lácteas e um pequeno percentual é seco, sendo mais comum a utilização do

soro para a produção de bebidas lácteas (MADRID et al., 1995; ALMEIDA et al., 2001; MACHADO et al., 2002; SMITH, 2003).

Entretanto, o aumento na produção de queijos e o mais rigoroso controle da disposição dos efluentes, levaram as indústrias leiteiras a investirem em novas técnicas de reaproveitamento do soro. Assim dados apontam que o Brasil, nos últimos anos, vem lentamente aumentando a produção interna de soro em pó, implicando em alta nas exportações de produtos lácteos e diminuição das importações (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2013).

Diante destes fatos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), criou em 2005, a Instrução Normativa nº 16, que estabelece as regras para o uso do soro em bebidas lácteas. Os rótulos dessas embalagens têm que ser de cor branca, deve mostrar a presença de soro, sua porcentagem e indicar que bebida láctea não é leite (BRASIL, 2005). Dois anos depois, a Instrução Normativa nº 28, de 2007 foi criada para regulamentar os concentrados e isolados proteicos de soro e as bebidas contendo apenas soro de leite (BRASIL, 2007). No entanto, mais recentemente, o MAPA, por meio da Portaria nº 53 de 10 de abril de 2013, submeteu à consulta pública o projeto do “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Soro de Leite” onde fixa parâmetros a serem atendidos pelo soro de queijo do tipo doce e do tipo ácido pasteurizado ou em pó e pelo soro em pó desmineralizado e reduzido em lactose (BRASIL, 2013). Um cuidado, até então, não mencionado foi implementado neste projeto, uma vez que dentre os requisitos físico-químicos foram estabelecidos limites máximos para a presença do íon nitrato que não deve ultrapassar 30 mg/kg de produto e cuja determinação deve ser feita pela metodologia oficial, o método espectrofotométrico (BRASIL, 2013; BRASIL, 2006).

O íon nitrato, na forma de nitrato de sódio ou potássio, é adicionado intencionalmente ao leite destinado à fabricação de queijos por uma necessidade tecnológica, uma vez que este promove reações inibindo a ação de bactérias, principalmente do gênero *Clostridium*, que causam o estufamento tardio ao longo da maturação dos queijos. No Brasil, esta adição é permitida em queijos de baixa umidade (até 35,9%) e média umidade (36 à 45,9%), no limite de 50 mg/kg, quantificado como íon nitrato, no produto a ser consumido (BRASIL, 1996). Porém, o valor adicionado ao leite, geralmente é em torno de 20 g/100L de leite e estudos mostram que cerca de 70% do nitrato adicionado é arrastado pelo soro lácteo, enquanto uma pequena parte se difunde na salmoura e outra parte fica retida no

queijo (ABREU et al., 1986). O nitrato pode sofrer a ação de xantinas oxidases e ser reduzido a nitrito.

Contudo, a ingestão desses íons pode causar danos à saúde humana, devido ao seu potencial efeito tóxico. O nitrito proveniente da redução do nitrato no organismo humano, pode tanto agir sobre a hemoglobina e originar a metahemoglobina (HILL, 1999), que se liga irreversivelmente ao oxigênio, sendo menos efetiva em transportá-lo para todo o organismo, quanto interagir com aminas e amidas, originando compostos N-nitrosos, como as nitrosaminas que, sob certas condições de exposição, são agentes potencialmente mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (MARTINS e MÍDIO, 2000).

Considerando que o soro lácteo é um excelente ingrediente alimentício, sendo utilizado em vários alimentos, incluindo desde bebidas lácteas, fórmulas infantis, sorvetes, sobremesas, queijos fundidos até alimentos para uso em dietas enterais (ZACARCHENCO et al., 2013), o controle destes íons na matriz láctea se faz conveniente.

No entanto, a espectrofotometria como metodologia oficial geralmente empregada, apresenta algumas desvantagens como a baixa frequência analítica (2 amostras por hora), necessidade de empregar colunas de cádmio bem como a sua regeneração, o descarte dos resíduos resultantes da regeneração, pré-tratamento das amostras e, além de ser um método laborioso, requer a utilização de diversos reagentes e expõe o analista a possíveis riscos para a saúde (LIMA et al., 2006).

Neste sentido, várias técnicas analíticas vêm sendo implementadas para a análise desses íons. Assim, a eletroforese capilar de zona (CZE), que é uma técnica de separação com base na migração diferencial de compostos iônicos ou ionizáveis pelo meio da aplicação de um campo elétrico através de uma solução eletrolítica contida dentro de um capilar, surge como uma alternativa bem promissora.

A CZE, frente à metodologia oficial, apresenta diversas vantagens como o reduzido volume de amostra e solventes, a alta eficiência e precisão, o curto tempo de análise, a baixa exposição do analista a riscos de contaminação, rapidez na obtenção dos resultados, alta taxa de amostragem, praticidade e, muitas vezes, a ausência de qualquer pré-tratamento da amostra (REIS, 2006).

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um método simples para a determinação simultânea dos íons de nitrito e nitrato em soro lácteo utilizando a técnica de Eletroforese Capilar de Zona (CZE).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O LEITE

De acordo com BRASIL (2011), em sua Instrução Normativa nº 62, leite é o produto resultante da ordenha realizada de forma completa e sem interrupção, em apropriadas condições higiênicas, de vacas saudáveis, bem nutridas e descansadas. Para o leite de outros animais, o nome dado deve compor o nome da espécie de que proceda.

Do ponto de vista biológico, o leite é um produto da secreção das glândulas mamárias de fêmeas mamíferas cuja função é a alimentação dos recém-nascidos. Já do ponto de vista físico-químico, o leite é uma combinação de várias substâncias sólidas, algumas dissolvidas e outras em suspensão na água, as quais participam com 12% a 13% do volume do leite. Consistem, sobretudo, em proteínas, gorduras, açúcares, sais minerais e vitaminas, conferindo ao leite a propriedade funcional e aptidão ao processamento (Anualpec, 2011). A composição do leite varia de acordo com a espécie, raça, individualidade, alimentação, entre outros fatores (SOARES, 2009).

O leite é constituído por proteínas insolúveis ou caseínas, que representam cerca de 27 g/L apresentando-se sob a forma de micelas de fosfocaseínato de cálcio e são facilmente degradadas por enzimas proteolíticas e por proteínas solúveis que se encontram no soro, dividindo-se em albuminas, globulinas e enzimas. Do ponto de vista fisiológico, as proteínas constituem o alicerce da vida, pois são consideradas indispensáveis na formação de tecidos, sendo imperativas na nutrição dos animais e do homem. Sendo o leite o alimento exclusivo da primeira idade, as proteínas do leite são, de todas as existentes, as mais completas e as que possuem todos os elementos imprescindíveis à primeira fase de vida (VALSECHI, 2001).

A fração lipídica do leite apresenta-se como pequenos glóbulos contendo principalmente triacilgliceróis, envolvidos por uma membrana lipoprotéica, predominando, na sua composição, os ácidos graxos palmítico e oleico. Os lipídeos do leite contribuem com o resultado energético final do leite, sendo também importante para a obtenção do sabor e odor do leite e seus derivados. Apresenta melhor rendimento na fabricação dos derivados o leite com maior teor de gordura. Fisiologicamente serve como fonte de energia e, devido ao seu elevado teor de

vitamina A e D, desempenha um importante papel no crescimento e desenvolvimento dos jovens, sobretudo durante o período em que a alimentação é exclusivamente ou predominantemente láctea (REIS et al., 2002).

Os açúcares do leite, são essencialmente constituídos pela lactose, cujo teor médio varia de 45 a 50 g/L, sendo o constituinte sólido menos variável no leite (PEREDA et al., 2005). A lactose é hidrolisada pela lactase intestinal em glicose e galactose por via enzimática. A sua presença no tubo digestório favorece a implantação de uma microbiota láctica que se opõe à instalação de uma microbiota de putrefação, favorecendo também, a assimilação do cálcio (VALSECHI, 2001).

No leite são encontrados teores consideráveis de sais tais como o cloro, fósforo, potássio, sódio, cálcio e magnésio e baixos teores de ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês formando os sais orgânicos e inorgânicos. O cálcio possui importância tecnológica especial, pois tem de estar presente em quantidade suficiente para que ocorra a coagulação da caseína pela ação da renina na fabricação de queijos. É importante na formação e manutenção do esqueleto e dos dentes e auxilia no equilíbrio de diversas funções orgânicas (REIS et al., 2002).

No leite, encontra-se ainda, outro grupo importante de constituintes, que embora estejam presentes em pequenas quantidades, desempenha papel fundamental devido a sua atividade, sendo estas as enzimas, as vitaminas e os hormônios (VALSECHI, 2001). O leite é uma importante fonte de vitaminas, algumas associadas à gordura (lipossolúveis), sendo estas as vitaminas A, D, E e K e outras associadas com a parte aquosa (hidrossolúveis). Dentre estas últimas, estão as vitaminas do complexo B e a vitamina C. Entretanto, com exceção da vitamina B2 (riboflavina), as outras são encontradas em pequenas quantidades (BRITO et al., 2006).

2.1.1 A produção de leite

A produção leiteira no Brasil, ao longo dos últimos 10 anos, vem crescendo substancialmente. Para mensurar essa evolução na produção, no período de 2004 a 2013, a produção brasileira de leite passou por um crescimento de aproximadamente 49%, saindo de uma produção de 23,5 bilhões de litros em 2004, alcançando uma produção de 35 bilhões de litros em 2013 e ainda projeções indicam que a produção de leite no Brasil ultrapassará os 37 bilhões de litros até o

final deste ano, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014).

O Brasil que já ocupa o quinto lugar no *ranking* mundial de produção leiteira exhibe mudanças no perfil de importador para exportador quando avaliamos as exportações e importações no ano de 2008 (EMBRAPA, 2013), quando as exportações brasileiras de produtos lácteos totalizaram US\$509,2 milhões, enquanto as importações totalizaram US\$213,2 milhões, o que gerou uma receita de US\$296 milhões, considerada um recorde histórico para o setor. Quando comparamos com o ano de 2007 onde as exportações foram de US\$273,3 milhões, houve um crescimento de 86% (MILKPOINT, 2013). Deste modo, a demanda apresentou um crescimento por parte das exportações de produtos lácteos brasileiros que passaram a fazer parte do mercado internacional.

A Figura 1 evidencia a evolução da produção de leite no Brasil, o que equivale a um aumento anual médio de 4,9%.

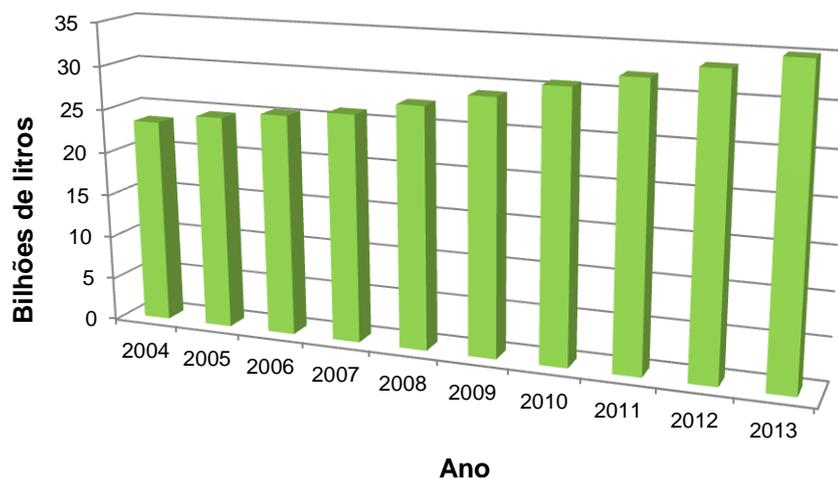


Figura 1: Evolução da produção de leite
Fonte: Adaptado de MILKPOINT, 2013.

2.2 O QUEIJO

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem associação

de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. (BRASIL, 1996).

Assim, o queijo, nada mais é do que o produto obtido pela coagulação da caseína do leite com aprisionamento da gordura e sais em suspensão, com liberação de soro lácteo (FOSCHIERA, 2004). É um alimento rico em proteínas de alto valor biológico, cálcio, fósforo, zinco, iodo, selênio, vitaminas e oligoelementos. Existe em todo o mundo mais de mil tipos de queijos, feitos a partir de distintos leites e processos de fabricação, com uma produção que excede doze milhões de toneladas (LÁCTEA BRASIL, 2014; FREITAS FILHO et al., 2009). Entretanto, embora estes queijos se diferenciem em forma e estrutura, todos envolvem essencialmente os quatro ingredientes (leite, coalho, microrganismos e sal), sendo processados por meio das principais etapas: produção de ácido, formação do gel, expulsão de soro e período variável de maturação (BERESFORD et al., 2001; FREITAS FILHO et al., 2009).

2.2.1 A história do queijo

A origem do queijo tem várias versões, inclusive uma lenda bastante conhecida que sugere que o queijo foi descoberto por Aristeu, filho do Deus grego Apolo, rei da Arcádia. Mas os historiadores mencionam a versão do mercador árabe como a mais plausível. Esta conta que um legendário mercador viajante da Arábia durante uma viagem pela Ásia fez uma parada para se alimentar. O homem carregava consigo tâmaras secas e dentro de um cantil feito de estômago seco de carneiro, certa quantidade de leite de cabra. No entanto, o homem percebeu que no cantil havia somente um líquido fino e aquoso, o qual denominou de coalhada branca. O coalho existente no estômago parcialmente seco do carneiro havia coagulado o leite resultando assim o queijo. Isso se passou há milhares de anos e ainda hoje, faz-se o queijo de modo semelhante: coagulando o leite com o coalho oriundo do estômago de bezerros (Valsechi, 2001), embora nos dias atuais sejam utilizados diversos tipos de agentes coagulantes.

Os egípcios estão entre os primeiros povos a obterem no leite e no queijo, fonte importante de sua alimentação. Roma, brilhante centro da civilização antiga, era um rico mercado para o queijo, porém, embora alguns queijos fossem fabricados

na Itália, a principal fonte de abastecimento era a Suíça, onde a vegetação das encostas dos Alpes fornecia abundante pastagem e, além do mais, havia a mais pura água de montanha. Assim, nasceu um produto mundialmente famoso e uma indústria que, séculos mais tarde se expandiu pelo mundo (VALSECHI, 2001).

2.2.1.1 A produção de queijo

Em uníssono com a produção leiteira está a produção de queijos no Brasil, que segundo projeções da Associação Brasileira das Indústrias de Queijos, ultrapassará 1 milhão de toneladas entre os anos 2013 e 2014 (ABIQ, 2014).

Com cerca de 25% da produção leiteira destinada a produção de queijos, com um consumo *per capita* em ascensão e uma taxa média de crescimento de 5% ao ano, o Brasil se destaca e ocupa o terceiro lugar em produção mundial de queijos (CARTA LEITE, 2010; ABIQ, 2014).

Segundo dados da ABIQ, os queijos mais produzidos no Brasil são a mussarela, o prato e o requeijão, seguido pelo queijo minas frescal e *petit suisse*, conforme detalha Figura 2 (ABIQ, 2014).

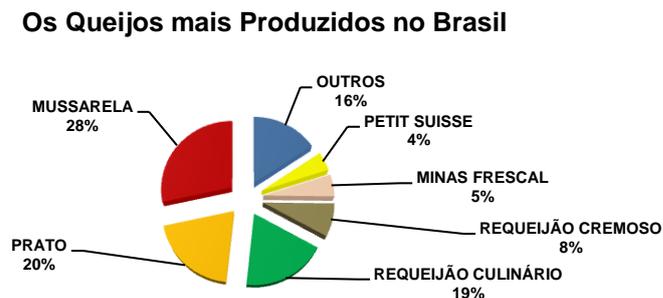


Figura 2: Produção de queijo no Brasil por tipo de produto.
Fonte: ABIQ, 2014.

2.2.2 O estufamento tardio

A produção de queijos está diretamente relacionada à qualidade do leite com o qual serão processados. Assim, alguns problemas podem surgir caso o leite utilizado não tenha qualidade satisfatória. Dentre os vários defeitos relacionados, podemos citar o estufamento tardio como o mais comum e frequente (ABREU et al., 1986), ocorrendo durante a maturação de queijos provenientes de leite contendo

quantidade maior que o normal de bactérias do gênero *Clostridium*, levando à fermentação butírica (BERESFORD et al., 2001; FURTADO, 1985). Nela, o lactato é transformado em butirato com concomitante formação de CO₂ (dióxido de carbono) e H₂ (hidrogênio). Esse defeito caracteriza-se pela formação de grandes buracos na massa (conforme mostram as Figuras 3 e 4) o que pode, em casos mais graves, levar à ocorrência de rachaduras na casca, conferir forte odor a ranço e sabor desagradável, tornando o queijo completamente impróprio para comercialização.



Figura 3: Queijo Emmental com olhaduras grandes e irregulares, caracterizando o estufamento tardio.

Fonte: Furtado, 2007.



Figura 4: Queijo prato bola com olhaduras grandes e irregulares, caracterizando o estufamento tardio.

Fonte: Costa, 2013.

Das espécies de *Clostridium* que ocorrem no leite, as mais comumente envolvidas na fermentação inadequada são *C. butyricum*, *C. sporogenes* e *C. tyrobutyricum*, sendo que esta última é geralmente apontada como a principal responsável pelo estufamento tardio. No entanto, Mesquita e colaboradores em estudo realizado em amostras estufadas de queijos provolone, parmesão e prato,

fabricados no Brasil, apontam o *C. butyricum* como o microrganismo mais frequentemente encontrado em amostras com estufamento tardio (MESQUITA et al., 2001).

A principal fonte de bactérias do gênero *Clostridium* no leite é a silagem de baixa qualidade usada como alimento do gado, mas elas podem advir também de contaminação com esterco durante a ordenha. Segundo estudos, não há consenso sobre o número mínimo de esporos capazes de provocar o defeito, mas sabe-se que acima de 200 esporos de *Clostridium* por litro de leite já ocorre o estufamento tardio. Essas bactérias podem utilizar como substrato a galactose, a sacarose e a glicose, a fermentação destas produz, além de ácido butírico, dióxido de carbono e hidrogênio, os ácidos propiônico e acético, acetona, butanol e etanol (FURTADO, 1985; MESQUITA et al., 2001).

Por uma necessidade tecnológica, o nitrato de sódio ou potássio é adicionado ao leite destinado a produção de queijos (com exceção dos queijos frescos), é reduzido a nitrito, pela ação das xantinas oxidases¹, durante a maturação (GALESLOOT, 1961). O nitrito é o agente que inibe a germinação e o crescimento dos esporos, porém não inibe a ação das bactérias lácteas (DEVOYOD, 1976). Assim, podem impedir o crescimento de bactérias do ácido propiônico, *Propionibacterium*, essenciais para a formação dos olhos característicos de queijos como o Emmental e, portanto, não é apropriado para controle de *Clostridia* neles. Além disso, ele pode reagir com aminoácidos aromáticos do queijo e formar nitrosaminas muitas das quais são carcinogênicas. Essa reação, entretanto, ocorre preferencialmente na faixa de pH entre 2,0 a 4,5, assim a maioria dos queijos, onde o pH é mais elevado, a formação de nitrosaminas ocorre lentamente (PERRY, 2004).

Resultados satisfatórios para a ação do nitrato são alcançados quando alguns parâmetros são atendidos, inclusive a presença de xantinas oxidases para a redução deste íon a nitrito. Assim, o uso deste oxidante é bastante efetivo quando a contaminação inicial do leite não exceder a 1.000 esporos/ litro de leite, quando o queijo apresentar um pH mais baixo (maior acidez), com baixa atividade de água

¹ A xantina - oxidase é uma enzima associada à membrana celular, gerando espécies reativas de oxigênio e é encontrada no leite sobre a superfície interna da membrana dos glóbulos de gordura, o molibdênio é ligado a esta enzima (ARDAM et al., 2004; GALESLOOT, 1961).

(teor de sal mais alto), além de um potencial de oxirredução mais elevado (massa menos compactada ou com maior índice de aerobiose) (FURTADO, 1999).

O soro lácteo arrasta a maior parte do nitrato adicionado (DEVOYOD, 1976) e, uma pequena parte difunde-se na salmoura, fazendo com que os níveis de nitrato encontrados no queijo pronto para consumo sejam, geralmente, bem menores que 50 mg/kg^{-1} . Em função do maior teor de umidade do soro em relação ao queijo, o nitrato é dissolvido pela água e uma pequena parcela fica adsorvida na superfície da micela de caseína coagulada (GOODHEAD et al., 1976).

Em alguns países o uso de nitratos na fabricação de queijos é proibido. A adição em excesso deste sal pode inibir a microbiota láctea, dificultando a maturação do produto e alterando sua cor e sabor (PERRY, 2004).

2.2.3 Aminas biogênicas

Aminas biogênicas são bases orgânicas alifáticas, cíclicas, de baixo peso molecular, produzidas pelo metabolismo de seres vivos em geral. São, por vezes, encontradas em alimentos e bebidas cuja produção envolve processos de fermentação e/ou maturação. Acredita-se que sejam biossintetizadas pela descarboxilação enzimática de aminoácidos. O queijo é um excelente meio para produção dessas aminas, pois possui as condições favoráveis de pH, concentração salina e teor de umidade para sua biossíntese, além dos aminoácidos e bactérias capazes de descarboxilá-los. Entre as bactérias capazes de produzir as aminas biogênicas têm-se espécies de *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Algumas destas estão presentes no queijo como parte de sua microbiota habitual e outras, em decorrência de contaminação. Em presença de nitritos essas aminas podem formar N-nitrosaminas, as quais têm comprovada ação carcinogênica, mutagênica e teratogênica (OLIVEIRA et al., 1995).

2.3 O SORO LÁCTEO

O soro lácteo, também conhecido como soro de leite, soro de queijo, lactossoro ou simplesmente soro, é um subproduto da indústria de laticínios. Representa a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação

do queijo, na produção de caseína e produtos similares (PAGNO et al., 2009). A coagulação se produz principalmente por ação enzimática (soro doce com pH entre 6,0 e 6,8) ou por acidificação (soro ácido com pH inferior a 6,0). Cerca de 80 a 90% do volume do leite destinado à fabricação de queijos resultam em soro lácteo, o qual contém, aproximadamente metade dos sólidos totais do leite, incluindo proteínas solúveis, sais e principalmente lactose (PACHECO et al., 2005; CHAVES et al., 2010).

2.3.1 Composição química

A composição e o tipo de soro de leite produzido industrialmente dependem do tipo de queijo fabricado e da tecnologia de processamento empregada na produção (SILVEIRA e ABREU, 2003).

De acordo com o processo tecnológico empregado e o pH final do produto, o soro de leite pode ser classificado como ácido ou doce (MIZUBUTI, 1994). Dentre os constituintes representados nas tabela 1 e 2, os que mais apresentam diferença significativa entre os soros ácido e doce estão a lactose, ácido láctico e sais minerais. No soro ácido o teor de ácido láctico pode ser até 8 vezes maior e, conseqüentemente, o teor de lactose é menor que o presente no soro doce. O cálcio está presente em concentração maior no soro ácido, bem como outras substâncias minerais presentes no leite (MADRID et al., 1995).

Algumas limitações da utilização do soro devem-se à alta carga orgânica, o que impossibilita o armazenamento prolongado devido ao rápido processo de fermentação e/ou deterioração que pode ocorrer. Para contornar esta situação é necessária a utilização rápida deste material, ou aplicação de medidas de conservação usando refrigeração e/ou adição de conservantes, para possibilitar a utilização das características potenciais do soro em outros alimentos (ALMEIDA, et al., 2001).

Tabela 1 – Composição do leite e dos soros doce e ácido.

Componentes	Leite (%)	Soro Doce (%)	Soro Ácido (%)
Sólidos totais	13,0	6,40	6,20
Proteína	3,6	0,80	0,75
Gordura	3,9	0,50	0,04
Lactose	4,6	4,60	4,20
Ácido láctico	-	0,05	0,40

Fonte: Adaptado de ANTUNES, 2003.

Tabela 2 – Composição mineral dos soros doce e ácido.

Componentes	Soro doce (mg/kg)	Soro Ácido (mg/kg)
Fósforo	412	649
Cálcio	466	1,251
Potássio	1,455	1,485
Sódio	505	528
Cloretos (NaCl)	2,195	2,208

Fonte: Adaptado de ANTUNES, 2003.

Neste trabalho utilizou-se soro lácteo doce, pH entre 6,0 e 6,8, proveniente da fabricação de queijos prato e parmesão.

2.3.2 Impacto ambiental

O controle da poluição ambiental produzida pelas indústrias laticinistas, observando as legislações ambientais vigentes e todas as ações previstas nas instruções normativas da Fundação Estadual de Meio Ambiente (FEAM), Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM), Instituto Estadual de Florestas (IEF) e Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) quando aplicados adequadamente contribuem para o fortalecimento dos elos produtivos e para valorização de práticas de gerenciamento de resíduos, com o objetivo de diminuir a carga poluidora proveniente da cadeia produtiva de leite (MACHADO et al., 2002).

Assim, além de desrespeitar as legislações em vigor, a destinação incorreta do soro lácteo pode conduzir a sérios problemas ambientais como a poluição das águas, geração de odor desagradável, bem como o comprometimento da estrutura físico-química do solo (RICHARDS, 2002; PORTO et al., 2005).

A carga poluente gerada pelo soro lácteo e representada pela Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) pode variar, geralmente, de 42.000 a 60.000 mg/L, contra cerca de 500 mg/L do esgoto doméstico (PAULA, 2005; BALDASSO, 2008). No entanto, o reaproveitamento do soro lácteo é uma alternativa importante não só do ponto de vista econômico, mas também ambiental (DRAGONE et al., 2009).

2.3.3 Benefícios à saúde

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (2014), o soro lácteo é rico em proteínas e cálcio, elementos capazes de atuar como antioxidantes, anticarcinogênicos e repositores minerais e energéticos, além de abaixar o LDL (*Low*

Density Lipoprotein - colesterol ruim) e, em concentrações específicas, a hipertensão. Pesquisas mostram que o soro do queijo tem poder imunomodulador, atividade antimicrobiana, antiviral, antiulcerosa e de proteção ao sistema cardiovascular (SGARBIERI, 2004).

Inúmeras pesquisas demonstram as propriedades nutricionais e funcionais das proteínas do soro, tais como: ação anticarcinogênica, antimicrobiana e antiinflamatória, transporte de retinol e transporte de imunidade passiva. Portanto, os estudos envolvendo o aproveitamento e a aplicação das proteínas do soro têm sido realizados e a cada dia são descobertas mais atividades biológicas para estas proteínas, que há pouco tempo eram descartadas (POPPI et al., 2010).

2.3.4. Utilização do soro em derivados lácteos e suas aplicações na indústria de alimentos

O soro de leite foi descoberto cerca de 3000 anos atrás, quando estômagos de bezerros foram usados para armazenar e transportar leite, resultando na transformação do leite em coalhada por meio da ação natural da enzima quimosina (coalho) localizada no estômago dos vitelos (SMITHERS, 2008).

Na Idade Média, o soro era utilizado em drogas farmacêuticas como componente de unguentos para queimaduras, como bálsamo para pele ou como porção neutralizante para cabelos, mas raramente era usado na alimentação humana (KOSIKOWSKI, 1979).

O uso do soro teve grande evidência em meados do século XIX, na Europa Ocidental, com a criação de mais de 400 “casas de soro”. Por volta de 1940, na Europa Central, foi usado no tratamento de dispepsia, uremia, gota, anemia, artrite, doenças hepáticas e até tuberculose, quando se recomendava a ingestão de cerca de 1.500g/dia de soro (HOLSINGER et al., 1974).

Os produtos de soro lácteo são indicados para todos os produtos lácteos por possuírem propriedades funcionais como capacidade de formação de gel, viscosidade, poder emulsificante, capacidade de retenção de água, que conferem uma série de benefícios estruturais e nutricionais ao produto final (BELLARDE, 2006).

A utilização do soro de leite em pó tornou o produto mais barato, sendo uma alternativa para a redução do preço agregado ao produto final. O Departamento de

Agricultura dos Estados Unidos (2014) relata que há uma redução de 770,83% no custo quando comparado o preço do soro de leite em pó com o leite em pó integral e de 583,33% em comparação com o leite em pó desnatado. O emprego do soro lácteo nos mais variados produtos, proporciona não só redução do produto final, mas também uma maior acessibilidade aos derivados lácteos por classes sociais mais baixas. A Figura 5 representa como o soro lácteo é reaproveitado.

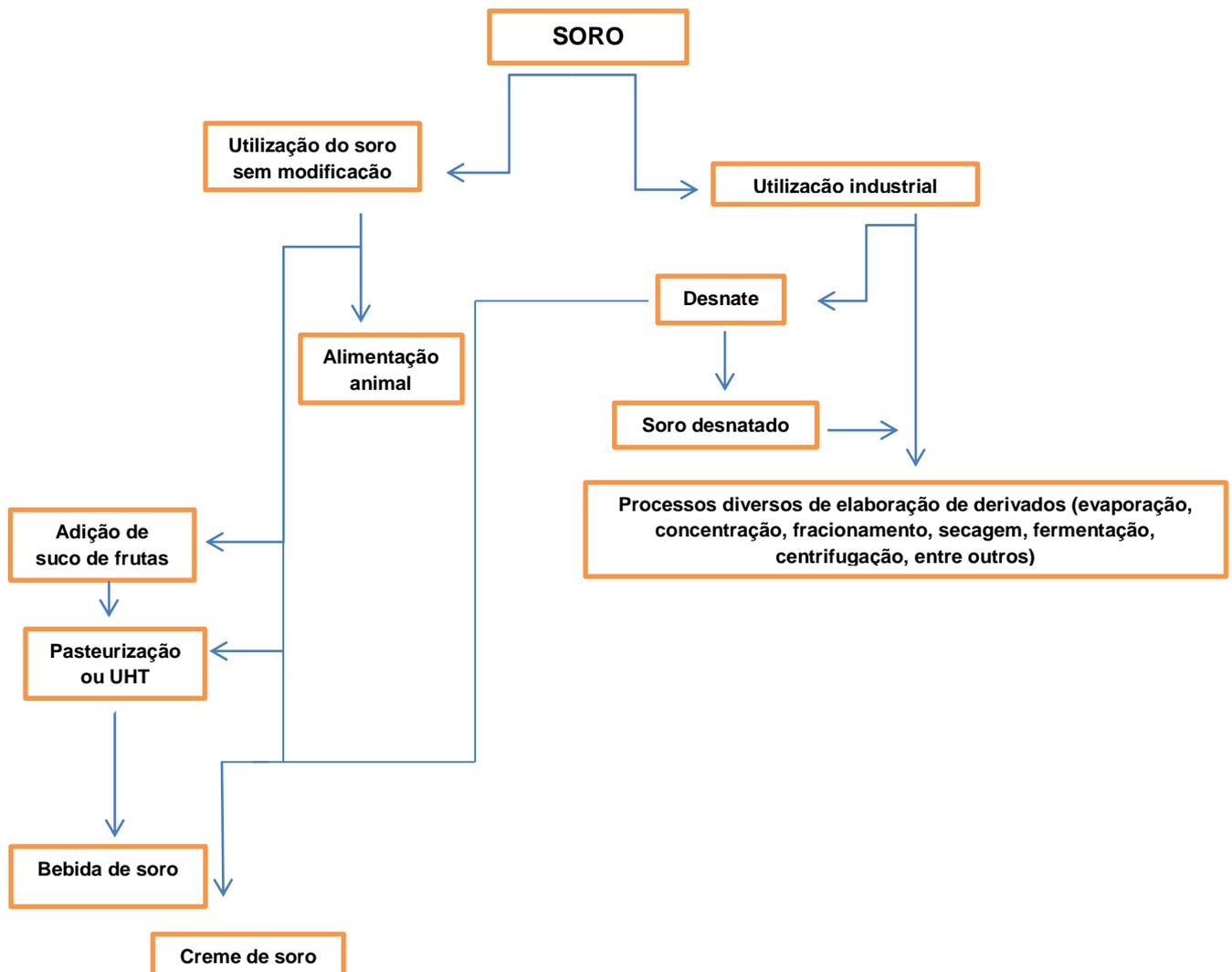


Figura 5: Reaproveitamento do soro lácteo.

Fonte: Adaptado de MAGANHA, 2006.

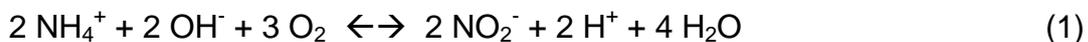
Na Figura 5 podemos observar que o soro lácteo é um ingrediente muito versátil, podendo ser transformado em soro concentrado para alimentação animal, soro em pó, concentrado, lactose, proteínas do soro, soro em pó desmineralizado, soro fermentado, soro com baixa lactose e vários outros.

2.4 NITRITO (NO_2^-) E NITRATO (NO_3^-)

O íon nitrato é a base conjugada do ácido nítrico (HNO_3) ácido forte ($\text{pK}_a = -1,37$) que se dissocia em água formando íons nitrato. O íon nitrito por sua vez é a base conjugada do ácido nitroso (HNO_2), ácido fraco ($\text{pK}_a = 3,37$) (ANDRADE, 2004).

Nitrato e nitrito são íons incolores (o nitrato apresenta um máximo de absorvância em 220 nm), inodoros, altamente solúveis em água e fracamente retidos no solo (NOLLET, 2000). Enquanto o nitrato é muito estável, o nitrito é altamente reativo e estão distribuídos naturalmente em alimentos vegetais e animais (FOX, 1983).

Na natureza, os íons nitrato e nitrito são formados através de um processo de oxidação biológica (nitrificação), a partir do íon amônio, de acordo com as reações (1) e (2):



Estas reações são mediadas por microrganismos do solo como as nitrosomonas, que oxidam o íon amônio a nitrito, realizando a primeira etapa da reação (1), e as nitrobactérias, que oxidam o nitrito a nitrato (2), tornando este último mais abundante no ambiente (PURVES et al., 2001).

Nitratos e nitritos estão, assim, presentes no solo, na água e nos vegetais e, portanto, distribuídos naturalmente em alimentos de origem vegetal e animal.

2.4.1 Ocorrência em alimentos

Os nitratos estão amplamente distribuídos no solo, água e vegetais. Sua presença no solo é imperativa para que as plantas possam realizar a síntese de suas proteínas celulares. Nitrato e nitrito são utilizados como aditivos alimentares na forma de seus sais de sódio ou potássio em produtos cárneos e em queijos. A presença de nitrato nas águas ocorre devido a sua elevada hidrossolubilidade, que aumenta consideravelmente sua concentração nas águas subterrâneas, rios e poços (ANDRADE, 2004).

A maioria dos compostos nitrogenados em águas naturais tende a conversão para nitrato, assim todas as fontes de nitrogênio, particularmente nitrogênio orgânico

e amônia, devem ser consideradas como fontes potenciais de nitrato. As fontes primárias de nitratos orgânicos incluem esgotos domésticos e rurais, para os nitratos inorgânicos que podem contaminar a água potável, destacam-se o nitrato de potássio e o nitrato de amônio, ambos largamente utilizados como fertilizantes. Os nitratos ocorrem naturalmente na água, em baixas concentrações, como produtos de estabilização aeróbia de matéria orgânica nitrogenada. Concentrações mais elevadas ocorrem por estabilização de esgotos, drenagem de áreas fertilizadas ou, ainda, oxidação de amônia de origem industrial (BRANCO e ROCHA, 1977).

O nível de nitrato pode variar amplamente, chegando até a 450 mg/L em regiões agrícolas onde são utilizados fertilizantes nitrogenados (CORNÉE et al., 1992). Nos vegetais, o nitrato se encontra naturalmente presente, visto que a planta absorve nitrato como fonte de nitrogênio para seu crescimento (WALKER, 1975). Em vegetais danificados ou em condições de armazenamento inadequadas, incluindo o binômio temperatura/tempo, há uma tendência de redução no teor de nitrato, com conseqüente aumento da concentração de nitrito. A conversão de nitrato a nitrito pode ser decorrente da ação da nitrato-redutase endógena ou da presença exógena de bactérias redutoras. A frigorificação é capaz de retardar o processo, sem, contudo, preveni-lo. Durante o processo de cozimento do alimento também pode ocorrer diminuição do teor de nitrato, visto que o íon tende a se difundir para a água de imersão (OLMEDO e BOSCH, 1988).

Já o teor de nitrito em vegetais crus, diferentemente do teor de nitrato, é baixo, geralmente menor que 2 mg/kg do produto, enquanto os vegetais fermentados ou em conservas podem conter teores de nitrato, superiores a 3500 mg/kg e níveis de nitrito cerca de aproximadamente 400 mg/kg (HOTCHKISS et al., 1992). Em alimentos industrializados, os sais de nitrato e nitrito são adicionados no processo de cura de carnes juntamente com sal, açúcar, temperos e outros ingredientes, objetivando a preservação do produto, desenvolvimento e fixação de cor, sabor, aroma, melhoria de rendimento e contribuindo para inibição de bactérias anaeróbicas como, por exemplo, o *Clostridium botulinum*. A adição de nitrato é empregada somente em processos de cura longa (JUDGE et al., 1989).

2.4.2 Aspectos toxicológicos

Os maiores riscos toxicológicos decorrentes da ingestão de nitratos e nitritos são: ocorrência de metahemoglobinemia e a formação de compostos N-nitrosos (WALTERS, 1992). Do ponto de vista fisiológico, ao ser ingerido, o nitrato é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal superior e poderá ser reduzido a nitrito devido à ação de Nars (nitrato redutases) bacterianas, que poderão estar presentes na cavidade oral, estômago, intestino delgado, intestino grosso e bexiga (WARD, 2005; LUNDBERG e GOVONI, 2004).

O nitrito ao chegar à corrente sanguínea pode causar metahemoglobinemia, nesse processo o íon ferroso da hemoglobina fica suscetível à oxidação pelo nitrito para a forma férrica que é instável para o transporte de oxigênio onde a oxihemoglobina passa a ser chamada de metahemoglobina (COSS et al., 2004; YANG e LEE, 2005; SILVA, 1998; FANQUIN e ANDRADE, 2004).

Apenas uma parcela muito pequena de metahemoglobina se encontra presente no sangue normal (até 2%), pois o eritrócito (hemácia) possui um sistema eficaz para reduzir o Fe^{3+} hemínico de volta ao estado Fe^{2+} chamado de sistema NADH-citocromo b5 metahemoglobina redutase. Consiste, principalmente, de NADH produzido pela glicólise, uma flavoproteína denominada citocromo b5 redutase (também conhecida como metahemoglobina redutase) e citocromo b5 que é, então, regenerado pela ação do citocromo b5 redutase (MURRAY, 1998).

As hemácias podem produzir metahemoglobinemias sob duas situações: quando existe uma deficiência da atividade da metahemoglobina redutase que é transmitida de forma autossômica recessiva (metahemoglobinemia hereditária) e quando há a ingestão de drogas ou substâncias químicas como, por exemplo, o nitrato que poderá ser reduzido a nitrito (metahemoglobinemia adquirida) (LORENZI, 1999).

A atenção maior deve ser voltada para os indivíduos mais suscetíveis que são:

- Crianças lactentes de até três meses de idade, pois a atividade da NADH-citocromo b5 redutase é de aproximadamente de 50-60% da atividade encontrada em adultos. Do mesmo modo o pH intestinal de crianças é altamente suficiente para contribuir para o crescimento de organismos intestinais que são particularmente eficientes na conversão do nitrato ingerido para nitrito (ZEMAN, 2002).

- Indivíduos com acidez gástrica reduzida que resulta na proliferação de espécies bacterianas capazes de reduzir nitrato para nitrito (GEFFNER, 1981).
- Mulheres grávidas, uma vez que o nitrito é conhecido por causar aborto espontâneo e ser teratogênico.

Os sinais mais evidentes ocorrem quando acima de 10 % da hemoglobina se encontra na forma de metahemoglobina que são descolorações azuladas da pele e mucosas (cianose), já acima de 30% os sintomas são fadiga, dor de cabeça, taquicardia e vertigem. Acima de 55% a 60 % a oxigenação dos tecidos fica inadequada podendo resultar em dispneia, acidose, arritmias, paralisias, coma e convulsões. A morte pode acontecer a níveis acima de 70 % (FURLANI e COMETTI, 2014).

Devido ao aspecto não convencional das membranas e mucosas a metahemoglobinemia costuma ser referida como doença do sangue azul e quando ocorre em crianças síndrome do bebê azul. Os casos de intoxicação estão geralmente relacionados com a ingestão de água contendo mais de 100mg/L de NO_3^- .

A formação de compostos N-nitrosos carcinogênicos (também conhecido como nitrosaminas ou nitrosamidas) ocorre da reação do nitrito entre amidas ou aminas secundárias ou terciárias, sendo um risco a saúde (KIANG et al., 1978).

As nitrosaminas (ou nitrosamidas) estão presentes em produtos alimentícios, farmacêuticos, amostras ambientais (água, solo, ar), pesticidas, herbicidas, cosméticos, entre outros. São carcinógenos fortes e mutáveis que produzem tumorações em muitas espécies e praticamente em todos os órgãos do corpo. São rapidamente metabolizadas e em indivíduos suscetíveis, apenas uma dose pode produzir tumorações, sendo considerado o que nível de exposição tolerável pelo homem para nitrosaminas mais voláteis é de 5 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (SANCHES et al., 2003).

Embora a metahemoglobinemia seja, em princípio, o mais ameaçador efeito da exposição ao nitrato, vários estudos sobre esta exposição têm sido ligados a uma variedade de efeitos como: aumento da tireoide, decréscimo na alimentação, interferência no metabolismo das vitaminas A e E e hipertensão. Todos esses efeitos têm sido observados em estudos epidemiológicos em seres humanos e são, frequentemente, sustentados por estudos de fisiologia humana e animal (BRUNING-FANN e KANEENE, 1993; SANTOS et al., 2005).

2.4.3 Aspectos da legislação

O limite admitido de nitrito e nitrato como aditivo alimentar depende, em particular, do produto alimentício e da legislação vigente de cada país.

Em 1986, por orientação do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, a utilização de nitrato foi permitida somente em certos produtos fermentados ou de cura longa (ANDRADE, 2004).

A adição de nitrato de sódio ou potássio em queijos, é permitida no Brasil no limite de 50 mg/kg^{-1} no produto a ser consumido (BRASIL, 1996). Quando consideramos o soro lácteo, a Portaria 53 de 10 de abril de 2013 que submeteu à consulta pública o projeto do “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Soro de Leite” traz em seu escopo o limite máximo de 30 mg/kg de produto para o íon nitrato (BRASIL, 2013).

O Comitê FAO/WHO (“*Food and Agriculture Organization/World Health Organization*”) de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA - “*Joint Expert Committee on Food Additives*”), em sua 59ª Reunião, reavaliou os limites de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para os íons nitrito e nitrato, com base nos últimos estudos toxicológicos existentes.

O JECFA, estabeleceu para o nitrito uma IDA de $0 - 0,07 \text{ mg/kg}^{-1}$ de peso corpóreo, expresso como íon nitrito (WHO, 2003). Para o nitrato, o Comitê manteve a (IDA) de $0 - 3,7 \text{ mg/kg}^{-1}$ de peso corpóreo, expresso como íon nitrato, a qual tinha sido estabelecida na sua 44ª reunião (WHO, 1996). O Brasil utiliza como referência os mesmos valores de IDA do Comitê da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 1996; FAO/WHO, 2003).

Deve-se ressaltar que a IDA não deve ser aplicada para crianças menores de 3 meses de idade. Alimentos destinados a crianças com menos de 6 meses de idade não podem conter nitrato e/ou nitrito como aditivos, devido a toxicidade destes íons. Dessa maneira, tanto do ponto de vista tecnológico, quanto de saúde pública, é muito importante a detecção do teor residual de nitrito em produtos alimentícios prontos, para confrontar com o preconizado pela legislação vigente (ANDRADE, 2004).

2.4.4 Aspectos analíticos na determinação de nitrito e nitrato

Existe uma infinidade de métodos analíticos desenvolvidos para a determinação e monitoramento de nitrato e/ou nitrito em matrizes alimentares, água, amostras biológicas, vegetais e solos. Embora o íon nitrato seja considerado de baixa toxicidade, sua determinação é de suma importância, uma vez que quando reduzido a nitrito, este pode representar um alto risco à saúde, dessa forma, há interesse na determinação de ambos.

2.4.4.1 Metodologia oficial

A determinação de nitrato e nitrito em leite, carnes e demais alimentos, segue o método oficial estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2006). Tal metodologia fundamenta-se na redução do nitrato a nitrito em meio alcalino pela passagem do extrato em coluna contendo cádmio metálico na forma esponjosa, com posterior quantificação do nitrogênio na forma de nitrito (NO_2) por espectrofotometria.

O método oficial para determinação do nitrito e nitrato envolve os procedimentos espectrofotométricos baseados na reação de Griess, na qual o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil)-di-hidrocloro de etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração vermelha. A absorção máxima para o produto colorido é de 540 nm (AOC, 1997).

A análise do nitrato presente na amostra é realizada reduzindo-o a nitrito em coluna de cádmio esponjoso, apresentando uma taxa de redução de, aproximadamente 99%. Sendo este um procedimento de determinação sequencial em duas alíquotas da mesma amostra, em que primeiro se determina o nitrito originalmente presente na amostra. Em seguida reduz-se o nitrato originalmente presente na amostra e determina-o na forma de nitrito. Por diferença entre a primeira e a segunda determinação, mensura-se a concentração de nitrato presente na amostra (AOAC, 1997).

Alguns fatores como concentração de amostras e reagentes, temperatura e pH do meio, por exemplo, podem influenciar diretamente na porcentagem da conversão nessa redução.

2.4.4.2 Metodologias alternativas

A literatura, ao longo dos anos, vem descrevendo diversas técnicas para a quantificação de nitrato e nitritos, conforme exhibe a tabela 3, estas técnicas se diferenciam quanto à determinação, podendo ocorrer de forma simultânea ou sequencial. A título de exemplo de técnicas que realizam a análise de nitrato e nitrito simultaneamente pode-se citar as técnicas voltamétricas e a eletroforese capilar (MOORCROFT et al., 2001). A determinação sequencial se baseia na detecção do íon nitrito inicialmente, seguido da redução do íon nitrato ao íon nitrito para sua posterior quantificação. Os valores dos teores de nitrato são obtidos por diferença. A estratégia de análise na determinação de nitrato e nitrito é dependente da metodologia a ser usada.

Tabela 3: Metodologias alternativas para determinação de NO_2^- e NO_3^- em diversas matrizes.

Amostra	Técnica	Analito	Referência
Água de Córrego	Eletroforese Capilar de Zona	$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	OLIVEIRA et al., 2012.
Soluções Aquosas	MPA (amperometria múltipla pulsada) com eletrodo composto de grafite e zeólita dopado com prata	$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	MANEA et al., 2010.
Águas Naturais	Espectrofotometria/FIA	$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	YUE et al., 2004.
Água	Quimiluminescência/FIA	$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	MIKUSKA e VECERA, 2003.
Diversas Matrizes	Potenciometria	NO_3^-	MOURZINA et al., 2003.
Espinafre, Alface	HPLC-UV	$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	BUTT et al., 2001.
Amostras Biológicas e Ambientais, Matrizes Alimentares	HPLC-detecção eletroquímica	$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	DI MATTEO e ESPOSITO, 1997.

Assim, o próximo tópico irá falar sobre a técnica empregada neste trabalho, a eletroforese capilar.

2.5 ELETROFORESE CAPILAR (EC)

2.5.1 Conceito

A eletroforese é uma técnica instrumental de separação, baseada na migração de espécies carregadas, em função da aplicação de um campo elétrico (SKOOG et al., 2006). Cada soluto migra à velocidade distinta de outro, devido à mobilidade eletroforética, específica para cada tipo de molécula. A velocidade é proporcional ao campo elétrico e depende principalmente da carga média das moléculas, do seu volume hidrodinâmico e da viscosidade do meio (LANDERS, 2008).

2.5.2 Histórico

Essa técnica foi introduzida em 1937 pelo químico sueco Arne Tiselius, o qual separou misturas de proteínas do soro sanguíneo em tubos contendo solução tampão sob o efeito de um campo elétrico (TISELIUS, 1930) e, por este trabalho ganhou o prêmio Nobel em 1948. No entanto, a eficiência de separação teve como fatores limitantes a instabilidade do aparelho e a baixa efetividade na dissipação do calor causado pelo efeito Joule (passagem de corrente através do meio condutor). Como a dissipação de calor, gerado no meio condutor, ocorria apenas pelas extremidades do tubo, a formação de gradientes de temperatura induziam gradientes de densidade que geravam fluxos convectivos causando o alargamento das bandas dos componentes, conseqüentemente prejudicando a separação (TAVARES, 1996; GERVASIO et al., 2003).

Já na década de 70, a técnica foi aperfeiçoada por Jorgenson e Lukacs, com a introdução de tubos capilares, cuja forma (elevada área superficial interna relativa ao volume) favoreceu a dissipação de calor, minimizando a convecção, o que permitiu a aplicação de campos elétricos mais intensos. Deste modo foi possível obter separações de alta eficiência, com a utilização de pequenos volumes de amostra e tempo de análise reduzido (JORGENSON e LUKACS, 1981; TAVARES, 1996). A partir deste momento houve um rápido progresso na técnica, até esta ser considerada a terceira grande técnica instrumental de separação e esse avanço foi motivado pela simplicidade experimental, pela variedade de modos de separação

que podem ser efetuados em um único capilar, pelos compostos passíveis de análise em cada modo e por ser ecologicamente correta e econômica (ALTRIA, 1995; ST. CLAIRE, 1996).

2.5.3 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

Existem diferentes modos de eletroforese capilar, como a cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC, “*micellar electrokinetic chromatography*”), isotacoforese capilar (CITP, “*capillary isotachopheresis*”), focalização isoelétrica capilar (CIEF, “*capillary isoelectric focusing*”), eletroforese capilar em gel (CGE, “*capillary gel electrophoresis*”) e eletroforese capilar de zona (CZE, “*capillary zone electrophoresis*”) ou em Solução Livre (“*Free Solution Capillary Electrophoresis*” - FSCE) (TAVARES et al., 1997b). O modo de separação em eletroforese capilar pode ser alterado utilizando diferentes tampões ou alterando o capilar (WESTON e BROWN, 1997).

O presente trabalho baseou-se no modo CZE da EC, que consiste em introduzir a amostra num tubo capilar na presença de uma solução tampão, ao qual é aplicado uma diferença de potencial. Após a geração de um campo elétrico ao longo do tubo capilar, os componentes da amostra migram com velocidade constante, independentemente uns dos outros, como consequência de suas mobilidades (TAVARES, 1996; SILVA et al., 2007).

Entre as características favoráveis inerentes à técnica estão a rapidez e a capacidade de se aplicar vários métodos de análise à mesma amostra utilizando o mesmo tubo capilar, além da quantidade reduzida de amostra (injeção na ordem de nanolitros), do baixo custo por análise, do alto poder de separação, está também o baixo consumo de reagentes e solventes e a completa automação da análise, com possibilidade de injeção e detecção em fluxo (LANDERS, 2008).

2.5.4 Instrumentação

O instrumento é composto de uma fonte de alta tensão, capilares (geralmente de sílica fundida com diâmetro interno de 15 a 100 μm e comprimento entre 30 e 150 cm), eletrodos (os de platina são os mais utilizados) e um detector (Figura 6) (ROUESSAC e ROUESSAC, 2007). A fonte de alta tensão estabelece um campo

elétrico ao longo do capilar podendo operar com tensão constante (-30 a 30 kV) e/ou corrente constante (-200 a 200 μ A).

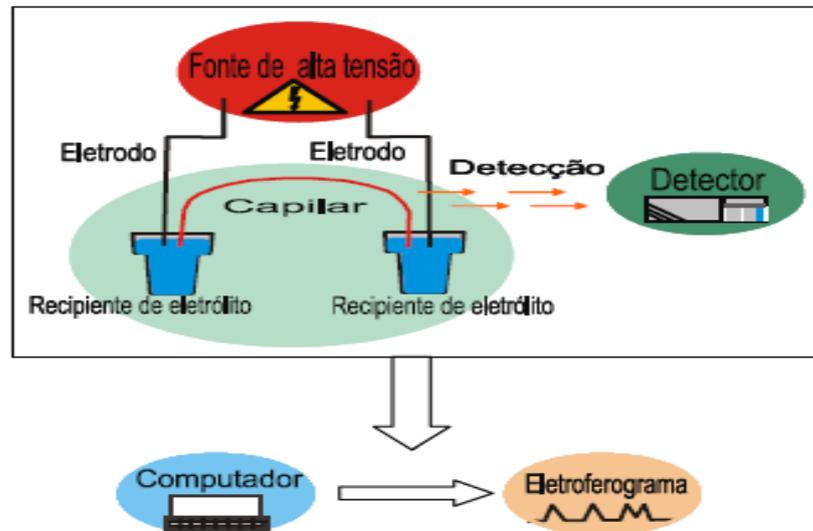


Figura 6: Diagrama esquemático de um equipamento de eletroforese capilar.
Fonte: HELLER, 2010.

Nos instrumentos disponíveis comercialmente, os capilares são mantidos dentro de um cartucho, que facilita a introdução do capilar no aparelho além de facilitar a dissipação do calor. O controle de temperatura do capilar é muito importante para assegurar a repetitividade das separações. O controle é realizado geralmente por ar ou líquido refrigerante, confinado no interior do cartucho onde se encontra o capilar (LANDERS, 2008; ROUESSAC e ROUESSAC, 2007).

O tubo capilar é, então, preenchido com um eletrólito de corrida, geralmente com propriedades tamponantes, e as extremidades são mergulhadas em recipientes (contendo a mesma solução), onde é aplicada uma diferença de potencial, que gera uma corrente elétrica no interior do capilar. Os eletrodos também são mergulhados na solução para fechar o circuito (JIMIDAR, 2006; LANDERS, 2008).

2.5.4.1 Introdução da amostra

A introdução da amostra no capilar pode ser feita de duas formas: injeção hidrodinâmica (pressão/tempo), através da criação de um gradiente de pressão entre os reservatórios da amostra e do eletrólito de corrida, enquanto as extremidades do capilar estão mergulhadas nestes reservatórios ou por injeção

eletrocínética (tensão/tempo), onde um determinado valor de potencial é aplicado entre os reservatórios da amostra e eletrólito durante um intervalo de tempo definido, enquanto a extremidade apropriada do capilar é inserida no reservatório da amostra, ao passo que a outra extremidade é colocada no reservatório do eletrólito de corrida (SILVA et al., 2007).

Na injeção hidrodinâmica, modo utilizado no presente trabalho, uma pequena alíquota (representativa da composição do soluto na amostra) é introduzida no capilar. Em termos de volume isso representa geralmente entre 1 a 10 nL dependendo das dimensões do capilar, do tempo de injeção, da viscosidade da solução tampão e da diferença de pressão estabelecida (TAVARES, 1996).

2.5.4.2 Sistemas de detecção

O processo de detecção em eletroforese capilar é desafiador devido às reduzidas dimensões do capilar que implicam em caminhos ópticos curtos e mínimo espaço para o uso de eletrodos. Os detectores podem ser classificados em dois tipos: os detectores universais que medem a diferença entre alguma propriedade do soluto em relação à solução (detectores de índice de refração e condutividade, entre outros que empregam métodos indiretos) e os detectores específicos que medem uma propriedade específica do soluto, que não é semelhante em todas as espécies, logo se limitam aos solutos que possuem a referida propriedade (fotodetectores baseados na absorção na região do UV/vis, na fluorescência, ou no espalhamento Raman, os espectrômetros de massas, os detectores amperométricos e os radiométricos). Os detectores específicos são mais sensíveis que os detectores universais e fornecem intervalos mais amplos de faixa linear de resposta (TAVARES, 1996).

Em eletroforese capilar de zona é comum utilizar o detector de arranjo de diodos (DAD), já que a sua aplicação torna viável o monitoramento da amostras em diferentes sinais durante a corrida, isso é possível porque cada matriz tem diferentes comprimentos de onda de absorção (sinal). A detecção é feita diretamente no capilar, já que a janela óptica é feita diretamente no mesmo (HEIGER, 2000).

2.5.5 Fundamentação teórica

De acordo com o tipo de analito presente na amostra, cada componente se desloca com uma mobilidade característica e, devido aos diferentes tipos de mobilidades existentes, cada uma recebe uma denominação correspondente, assim algumas definições são necessárias para melhor compreensão:

- Mobilidade Iônica: é a mobilidade do íon totalmente dissociado à diluição infinita;
- Mobilidade Efetiva: é a mobilidade de um íon num determinado pH;
- Mobilidade Eletrosmótica: é o valor da mobilidade do fluxo eletrosmótico (FEO);
- Mobilidade Aparente: é a mobilidade obtida diretamente de um eletroferograma (TAVARES, 1996; LANDERS, 2008).

A mobilidade iônica ou eletroforética (μ_e) é diretamente proporcional à carga (q) e inversamente proporcional ao raio hidratado (r) e a viscosidade do meio (η), conforme pode ser observado na equação 1:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

Com a aplicação da tensão, as espécies carregadas adquirem velocidades eletroforéticas (v_e) dependentes do campo elétrico (E) gerado no capilar e da mobilidade eletroforética (μ_e) de cada espécie (equação 2).

$$v_e = \mu_e E \quad (2)$$

A (μ_e) pode apresentar variações em seus valores para uma mesma espécie dependendo do eletrólito de corrida utilizado na separação. Neste momento, introduz-se o conceito de mobilidade efetiva (μ_{ef}) formulado a partir da função de distribuição das espécies (α), conforme a Equação 3:

$$\mu_{ef} = \sum \alpha \mu_e \quad (3)$$

O conceito de mobilidade efetiva é muito importante, pois a resolução entre dois analitos com mobilidades muito próximas em uma determinada matriz é obtida através da escolha adequada dos componentes do eletrólito de corrida e,

consequentemente, do seu pH ou pela adição de alguma substância ao eletrólito de corrida, bastando que os pKas das espécies de interesse sejam diferentes para que se promova a separação com uma boa seletividade.

Além da mobilidade, outro fenômeno responsável pela separação das substâncias em EC é o fluxo eletrosmótico. O capilar é constituído de sílica fundida, nesse material existem grupos silanóis (SiOH) que, em um determinado intervalo de pH se ionizam, deixando as paredes do capilar carregadas negativamente e cargas positivas livres em solução, para manter a eletroneutralidade dentro do tubo. Uma camada de cátions formada pelos contra-íons do eletrólito de corrida e água (H₂O) adere à parede do capilar. A primeira camada de cátions (+) não tem carga suficiente para neutralizar a superfície de ânions (-) do capilar. Logo, mais cátions hidratados são atraídos, resultando em um fenômeno de dupla camada elétrica. A concentração de íons de carga oposta na superfície diminui com a distância da parede e, esta região é conhecida como camada difusa da dupla camada elétrica (TAVARES, 1996).

Quando um campo elétrico é gerado no capilar, a camada difusa é afetada por forças elétricas e começa a migração dos íons em direção aos eletrodos de carga oposta; como esses íons estão solvatados por moléculas de água, esse deslocamento promove um fluxo de solução chamado fluxo eletrosmótico (Figura 7). Esse fluxo é o responsável por arrastar os analitos, independentemente de suas cargas, em direção ao detector (TAVARES, 1996).

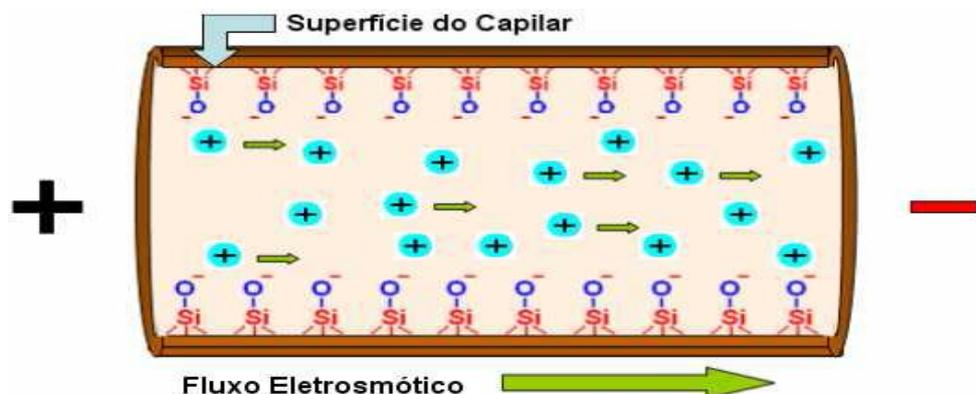


Figura 7: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico.
Fonte: GONÇALVES FILHO, 2007.

A magnitude do fluxo eletrosmótico pode ser mensurada em termos de velocidade ou mobilidade segundo as equações 5 e 6 (SCHWER e KENNDLER, 1991; KIRBY e HASSELBRINK JR, 2004).

$$v_{osm} = -\frac{\varepsilon\varepsilon_0\zeta}{\eta}E \quad (5)$$

$$\mu_{osm} = -\frac{\varepsilon\varepsilon_0\zeta}{\eta} \quad (6)$$

Onde v_{osm} é a velocidade do FEO, ε_0 é a permissividade ao vácuo, ε é a constante dielétrica, ζ é o potencial zeta, η é a viscosidade da solução de eletrólito utilizada, E é o potencial aplicado e μ_{osm} é a mobilidade do FEO.

De acordo com estas expressões, o fluxo eletrosmótico é diretamente proporcional ao potencial zeta (ζ), uma vez que, as outras incógnitas são constantes físicas. O potencial zeta é uma diferença de potencial existente muito próxima à superfície do capilar, gerada a partir da dupla camada elétrica. Este depende da carga na superfície da parede do capilar e a carga depende do pH, sendo assim, o FEO é diretamente proporcional ao pH do eletrólito (SCHWER e KENNDLER, 1991).

Abaixo de pH 4,0, a ionização dos grupos silanóis é pequena e o FEO não é significativo, enquanto que acima de pH 8,0 os grupamentos silanóis ficam completamente ionizados e portanto o FEO é considerado alto (HAYES e EWING, 1992).

O potencial zeta é gerado em todo o comprimento do capilar e produz uma velocidade de fluxo uniforme sem geração de pressão. Sendo assim, pode-se dizer que o perfil do FEO é plano e esta característica faz com que a EC não promova o alargamento dos picos em razão do fluxo, pois os analitos se movem com velocidades muito próximas (Figura 8)(TAVARES, 1996).

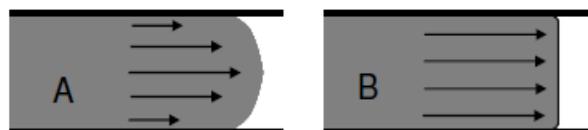


Figura 8: Perfil de fluxo gerado por pressão (A) e o fluxo eletrosmótico (B).
Fonte: HELLER, 2010.

Em EC, existem dois modos de análise, conforme ilustra a Figura 9: o co-eletrosmótico (em que os analitos migram na mesma direção e sentido do FEO) e o contra-eletrosmótico (os analitos migram na mesma direção, mas em sentido oposto ao FEO) (TAVARES, 1997a).

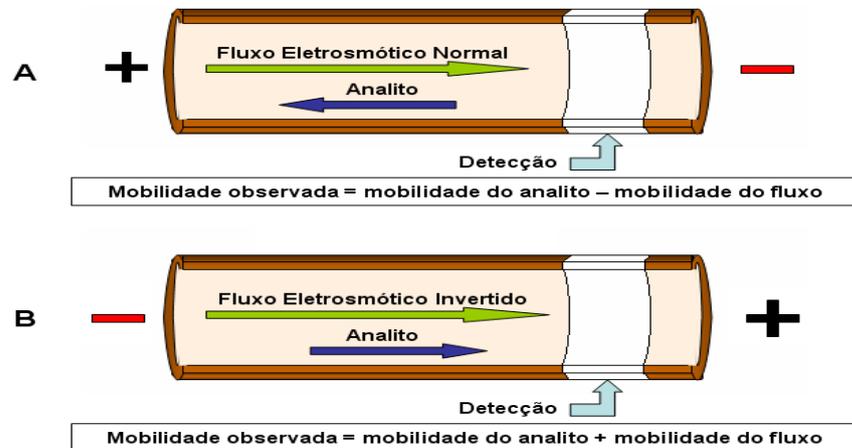


Figura 9: Representação esquemática dos modos de operação em eletroforese capilar. A) contra-eletrosmótico; B) co-eletrosmótico.
Fonte: GONÇALVES FILHO, 2007.

Com a existência do FEO fica claro que a migração das espécies em EC não depende apenas das próprias mobilidades eletroforéticas, mas também da mobilidade do fluxo eletrosmótico e, esta por sua vez, depende da escolha da composição do eletrólito de corrida.

2.5.6 Aditivos

Na eletroforese capilar de zona é comum o uso de aditivos no eletrólito de corrida para minimizar a adsorção de compostos com a parede do capilar, facilitar a solubilidade da amostra e/ou alterar a mobilidade dos analitos ou do fluxo eletrosmótico (TAVARES, 1997a).

Na separação de analitos aniônicos pelo modo coeletrosmótico deve-se considerar um requisito importante, a inversão do fluxo eletrosmótico, obtida pela inversão da polaridade de separação, assim como, com o uso de sais quaternários de amônio, como brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB) ou brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Estes surfactantes invertem o fluxo eletrosmótico através

da formação de uma camada carregada positivamente junto à parede do capilar, enquanto que o seio da solução fica neutro conforme mostra a Figura 10.

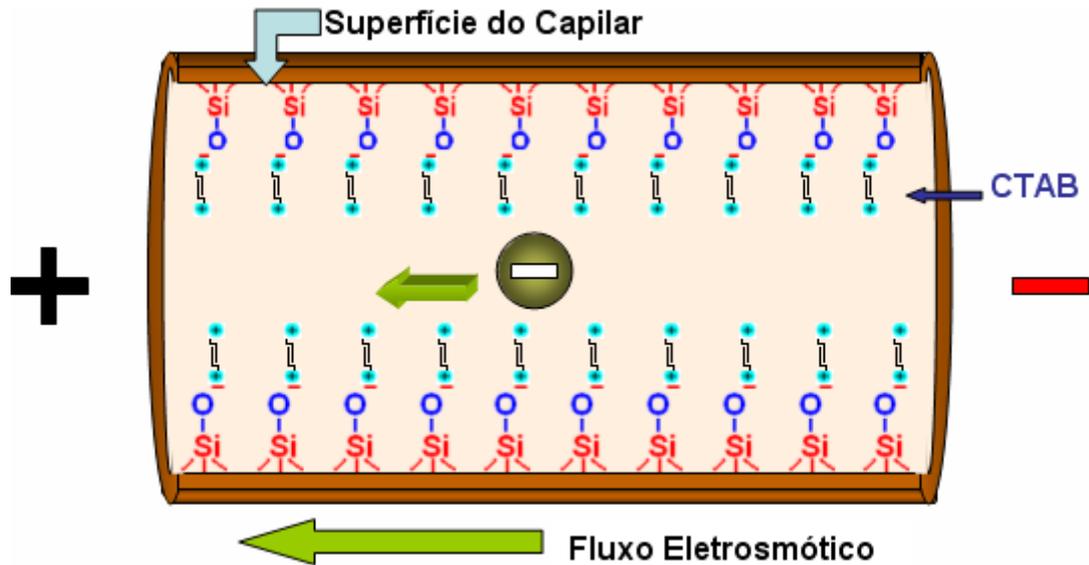


Figura 10: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico invertido.
Fonte: GONÇALVES FILHO, 2007.

Neste trabalho, optou-se pelo CTAB para reverter o fluxo eletrosmótico.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica simples para separação, identificação e quantificação simultânea dos íons de nitrito e nitrato em amostras de soro lácteo, utilizando a técnica de Eletroforese Capilar de Zona (CZE).

3.2 ESPECÍFICOS

- Testar *software* de simulação de parâmetros de eletrólito de corrida e separação eletroforética para otimização sistemática do método;
- Avaliar os possíveis efeitos de matriz em amostras de soro lácteo.
- Quantificar o total de nitrito e nitrato presente no soro lácteo proveniente da produção de queijos cuja tecnologia envolve a adição de nitrato sódio;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e água foi purificada por deionização (Sistema de osmose reversa Quimis, São Paulo, Brasil). O Tris-metilaminometano (TRIS) e o ácido clorídrico (HCl) foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), o brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamônio (CTAB) foi obtido da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). O hidróxido de sódio (NaOH) foi obtido da Synth (São Paulo, Brasil). As soluções padrões de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

Soluções estoques dos componentes do eletrólito de corrida foram preparadas com concentrações de 200 mmol L^{-1} de TRIS, 120 mmol L^{-1} de HCl e 20 mmol L^{-1} de CTAB.

As soluções estoque de TRIS e HCl foram mantidas sob refrigeração (5°C). Já a solução estoque de CTAB foi mantida à temperatura ambiente (para evitar formação de cristais) bem como a solução estoque de NO_3^- 1000 mg/L e o NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Já a solução estoque de NO_2^- 1000 mg/L foi mantida sob refrigeração (5°C), conforme orientação do fabricante.

O eletrólito de corrida foi composto por 100 mmol L^{-1} de TRIS, 50 mmol L^{-1} de HCl e $0,150 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB, com pH em torno de 8,20.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

Os experimentos foram realizados em um equipamento de EC modelo HP7100 da marca Agilent Technologies (Palo Alto, CA, E.U.A.) disponível na Universidade Federal de Juiz de Fora, equipado com um detector de arranjo de diodos, comprimento de ondas ajustado em 210 nm , temperatura controlada no interior do cartucho em 25°C e aquisição e tratamento dos dados em *software* ChemStation. O capilar utilizado foi de sílica fundida com revestimento externo de polimida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) com comprimento total de $48,5 \text{ cm}$ e comprimento efetivo até o detector de $40,0 \text{ cm}$, $50 \mu\text{m}$ de diâmetro interno e $365 \mu\text{m}$ de diâmetro externo. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente pela extremidade mais afastada do detector (“inlet”) sob pressão de 50 mbar por 5

segundos. A tensão aplicada para a separação foi de -15 kV, com polaridade negativa no lado da injeção.

As condições eletroforéticas foram adaptadas do trabalho de Oliveira et al., (2012) que determinaram NO_2^- e NO_3^- em águas de córregos utilizando eletroforese capilar de zona. As condições foram otimizadas em função da complexidade da amostra de soro lácteo.

4.3 AMOSTRAS

4.3.1 Coleta das amostras

Foram analisadas amostras de soro lácteo, fornecidas pelo Instituto de Laticínios Cândido Tostes, localizado na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais. Estas amostras foram provenientes da produção de queijos prato e parmesão, que embora apresentem diferentes características e tecnologias de produção, são queijos nos quais pode ocorrer o estufamento tardio durante a maturação. Assim, durante a produção foram adicionados 40 mL de nitrato de sódio (NaNO_3) solução à 50% m/v para cada 100 litros de leite, para prevenir tal defeito.

As amostras de soro lácteo foram coletadas ao final da primeira mexedura (com duração média de 20 minutos) em frascos apropriados e conservadas em geladeira sob temperatura de 10°C por até dois dias ou congeladas até a realização das análises.

Algumas amostras de soro lácteo provenientes da produção de queijo Minas frescal (sem adição de nitrato de sódio ou potássio), foram cedidas pelo Laticínio Coalhadas, localizado na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais.

As amostras foram coletadas ao final da produção e acondicionadas em frascos apropriados e conservadas em geladeira sob temperatura de 10°C por até dois dias ou congeladas até a realização das análises.

4.3.2 Preparo das amostras

As amostras de soro lácteo (quando congeladas) foram descongeladas gradualmente em geladeira, evitando choque térmico. Em seguida foram centrifugadas por 5 minutos a 6000 rotações por minuto (R.P.M.) com uma força

centrífuga relativa ou força gravitacional de 2350 x g, separando em duas fases, onde a porção intermediária foi pipetada e posteriormente diluída conforme mostra a tabela 4.

Tabela 4: Esquema de preparo e diluição das amostras e padrões de NO_2^- e NO_3^- .

Tipo	Amostra	Água	Padrão*	Total
Amostra 1:10	1000 μL	9000 μL	–	10000 μL
Amostra 1:10 + Padrão MIX	1000 μL	(9000 μL - MIX)	MIX ($\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$)	10000 μL
Amostra 1:10 + Padrão			NO_2^-	10000 μL
NO_2^-	1000 μL	(9000 μL - NO_2^-)		
Amostra 1:10 + Padrão			NO_3^-	10000 μL
NO_3^-	1000 μL	(9000 μL - NO_3^-)		
Padrão MIX	–	(10000 μL - MIX)	MIX ($\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$)	10000 μL
Padrão NO_2^-	–	(10000 μL - NO_2^-)	NO_2^-	10000 μL
Padrão NO_3^-	–	(10000 μL - NO_3^-)	NO_3^-	10000 μL

*Os volumes variaram de acordo com a concentração desejada, partindo de uma solução estoque de 1000 mmol L^{-1} de NO_2^- e NO_3^- .

MIX = $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$

Todos os dias, no início das análises, uma amostra da água deionizada foi analisada (branco) para verificar a possível presença de nitrito e nitrato.

4.4 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Quando o capilar novo foi utilizado, este foi condicionado por flush de pressão com solução aquosa de NaOH 1,0 mol L^{-1} por 30 minutos, água deionizada por 10 minutos e solução de eletrólito por 15 minutos, conforme mostra a tabela 5.

Tabela 5: Procedimento para condicionamento do capilar novo (nunca utilizado)

Procedimento	Eletrólito	Tempo (minutos)
Flush	NaOH 1 mol L^{-1}	30
Flush	Água deionizada	10
Flush	Eletrólito	15

A cada dia, antes do início das análises, o capilar foi pré-condicionado com solução aquosa de NaOH 1,0 mol L^{-1} por 5 minutos, água deionizada por 10 minutos e com eletrólito de corrida por 15 minutos. Entre as determinações o capilar foi condicionado durante 3 minutos com o eletrólito de corrida, como detalha a tabela 6.

Tabela 6: Procedimento para pré-condicionamento diário do capilar.

Procedimento	Eletrólito	Tempo (minutos)
Flush	NaOH 1mol L ⁻¹	5
Flush	Água deionizada	10
Flush	Eletrólito	15
Flush entre corridas	Eletrólito	3

4.5 SOFTWARES

Foi utilizado o software PEAKMASTER[®], versão 5.3, para calcular a migração dos analitos em função de determinados parâmetros de entrada (JAROS et al., 2011). Esses parâmetros envolvem concentração dos componentes do eletrólito de corrida, pKa e mobilidade iônica de todas as espécies envolvidas na separação. Valores tabelados para uma gama de compostos (~ 400) foram incluídos e podem ser selecionados dentro do programa. Além disso, o usuário pode especificar uma variedade de outros parâmetros, tais como o comprimento capilar (total e efetivo), tensão aplicada, polaridade, presença e mobilidade do fluxo e o tipo de sinal pode ser escolhido entre condutividade, detecção direta ou detecção indireta. Além disso, a mobilidade pode ser automaticamente ajustada para levar em consideração o efeito da força iônica (JOHNS et al., 2009). A saída do programa é exibida como um eletroferograma simulado, juntamente com os dados tabulados, incluindo a mobilidade efetiva e tempos de migração para cada analito.

O software Statistical Package for Social Science (SPSS[®]) da IBM[®] versão 22.0, foi utilizado em conjunto com o software Microsoft Excel[®] 2010 para tratamento estatístico dos dados obtidos.

4.6 ESTUDO DA LINEARIDADE

Refere-se à relação funcional entre o valor esperado para o sinal ou resposta e a quantidade de analito e é apresentado na forma de um gráfico que relaciona as respostas do equipamento em função de várias concentrações do analito. A linearidade se refere à capacidade da curva em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (SANTANA et al., 2007).

Para o estudo de linearidade foi construída uma curva de adição de padrão e uma curva de calibração externa, ambas em seis níveis de calibração (10, 20, 40, 60, 80 e 100 μL de $\text{NO}_3^-/10 \text{ mL}$) e calculada a partir da equação da regressão linear (equação 12).

$$y = ax + b \quad (12)$$

Sendo:

y = Resposta medida

x = Concentração

a = Inclinação da curva de calibração (sensibilidade)

b = Interseção com o eixo y

4.6.1 Avaliação do efeito de matriz na porcentagem de recuperação dos analitos

Para avaliar o efeito de matriz em amostras de soro lácteo na análise de nitrato e nitrito por eletroforese capilar de zona foi feito o teste de superposição de matriz.

Quando soluções padrão preparadas em água deionizada e analisadas por eletroforese capilar de zona, apresentam respostas diferentes das mesmas soluções padrão preparadas no extrato da matriz, isenta dos analitos, caracteriza-se o efeito de matriz. Para avaliar essa influência dos compostos na matriz foram preparadas duas séries de soluções padrão contendo os dois analitos nas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg L^{-1} . A primeira série foi preparada pela diluição dos padrões, contendo somente o NO_3^- (uma vez que em amostras reais não foi identificado o NO_2^-), em água deionizada. A segunda série dos padrões foi preparada pela diluição dos padrões no extrato da matriz, soro lácteo proveniente da produção de queijo minas frescal (isentas dos analitos). Foi feito um sorteio elencando a ordem de preparo das diluições bem como a ordem de análise no equipamento, a fim de garantir independência dos resultados. Foram feitas triplicatas autênticas em todos os níveis de concentração.

4.6.2 Verificação da falta de ajuste

Para verificar se as concentrações satisfaziam ao modelo linear foi necessário primeiramente retirar os *outliers* (valores aberrantes da análise), no máximo 3 valores, que correspondem a aproximadamente 22%, por se tratar de um conjunto de 18 dados, utilizando o método dos resíduos padronizados Jackknife (HORWITZ 1995). Posteriormente foi realizada a avaliação dos resíduos da regressão, através do MMQO (método dos mínimos quadrados ordinários) que parte da premissa que os resíduos seguem a distribuição normal, têm variância constante ao longo do eixo x e são independentes. Tais premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas quanto à normalidade por Ryan e Joiner (1976); homogeneidade por Cochran e independência dos resíduos de regressão por Durbin e Watson (1951). O teste F foi conduzido para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação da significância da regressão (DRAPER e SMITH 1998).

4.7 FIGURAS DE MÉRITO

As figuras de mérito foram estudadas conforme descrito pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2001) e EURACHEM (1998). Os parâmetros avaliados foram: precisão (através do coeficiente de variação e repetitividade), exatidão (através da recuperação), limites de detecção e quantificação (LD e LQ), linearidade e faixa de trabalho. Inicialmente a amostra de soro lácteo foi analisada em duplicata visando determinar o teor inicial do analito estudado.

a) Precisão

a1) Coeficiente de variação

Utilizou-se a equação 7, para o cálculo do coeficiente de variação.

$$CV = 100 \times \frac{s}{\bar{x}} \quad (7)$$

Onde s é o desvio padrão da amostra e \bar{x} é a média amostral.

a2) Repetitividade (r)

A repetitividade é caracterizada como o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando efetuadas sob as mesmas condições de medição (LINK, 2000). Neste trabalho, as medidas foram obtidas por um único operador, utilizando o mesmo equipamento de medição e método, ao medir repetidas vezes (30 vezes) uma mesma grandeza de uma única amostra (soro lácteo).

A repetitividade, normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição, tem três formas de expressá-la: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação. A partir do desvio-padrão dos resultados dos ensaios sob condição de repetitividade, a repetitividade (r) foi calculada conforme equação 8, o que capacita o analista a decidir se a diferença entre análises realizadas é significativa:

$$r = t \times \sqrt{2} \times s \quad (8)$$

Sendo: s o desvio-padrão da amostra e t a distribuição de *Student*, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança (95%).

b) Exatidão

A recuperação do analito foi estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo (adição de padrão ou spike), a concentração adicionada foi de 40 µL/1000 µL. Foram preparadas 10 alíquotas de uma mesma amostra e todas foram analisadas em triplicatas, por um mesmo analista, em um curto período de tempo e utilizando o mesmo equipamento. O cálculo foi realizado conforme equação 9:

$$R (\%) = \left(\frac{c_1 - c_2}{c_3} \right) \times 100 \quad (9)$$

Sendo:

R = Recuperação

C1 = Concentração do analito na amostra fortificada

C2 = concentração do analito na amostra não fortificada

C3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada

c) Limite de Detecção – LD

O limite de detecção refere-se à menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada e pode ser expresso tanto pelo método visual, relação sinal-ruído ou por parâmetros da curva analítica (CURRIE, 1999). O LD foi calculado conforme a equação 10.

$$LD = \frac{3sb}{m} \quad (10)$$

Onde m é sensibilidade da calibração (inclinação) e sb é o desvio-padrão da amostra (região adjacente ao pico de NO_3^- , onde não havia nenhum pico).

d) Limite de Quantificação - LQ

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis sob as condições experimentais adotadas, e pode ser expresso da mesma forma que o limite de detecção (CURRIE, 1999). Para a determinação do LQ utilizou-se a equação 11.

$$LQ = \frac{10sb}{m} \quad (11)$$

Onde m é sensibilidade da calibração (inclinação) e sb é o desvio-padrão da amostra (região adjacente ao pico de NO_3^- , onde não havia nenhum pico).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTES PRELIMINARES

Por se tratar de uma matriz complexa, foram realizados testes preliminares para limpeza e extração da amostra de soro lácteo. Geralmente, as amostras alimentícias destinadas as análises de nitrato e nitrito, passam por um processo de desproteinização, utilizando na maioria das vezes vários reagentes/solventes, como por exemplo o tetraborato de sódio (Bórax). A desproteinização é seguida por uma etapa de clarificação da amostra utilizando ferrocianeto de potássio e acetato de zinco. No entanto, o controle do pH é de suma importância, pois de acordo com Usher e Telling (1975), a extração deve ser realizada em pH neutro, ou levemente alcalino, uma vez que o nitrato e o nitrito são instáveis em pH menor que 5,0.

5.1.1 Testes com tetraborato de sódio (Bórax)

Neste foram realizados testes adicionando à amostra de soro lácteo tetraborato de sódio 130 mmol L^{-1} , conforme mostra a tabela 7:

Tabela 7: Esquema de preparo e diluição das amostras, utilizando Bórax.

Amostra	Quantidade de Bórax	Tempo de Centrifugação*	Filtragem (0,45 μm)
2 mL	1 mL	5 min a 6000 R.P.M.	Sim
2 mL	2 mL	5 min a 6000 R.P.M.	Sim
1 mL	2 mL	5 min a 6000 R.P.M.	Sim

* Força centrífuga relativa ou força gravitacional de $2350 \times g$.

Após a filtragem as amostras foram diluídas em água deionizada na proporção de 1:50 (amostra:água) e injetadas no equipamento, porém os resultados não foram satisfatórios, pois o eletroferograma só apresentou ruídos e nenhum analito foi identificado, conforme mostra o eletroferograma A da Figura 11. Os testes foram repetidos com uma diferença, as amostras de soro lácteo foram dopadas com padrões de nitrato e nitrito em concentrações conhecidas, mais uma vez os resultados foram negativos, não houve identificação dos analitos, conforme mostra o eletroferograma B da Figura 11.

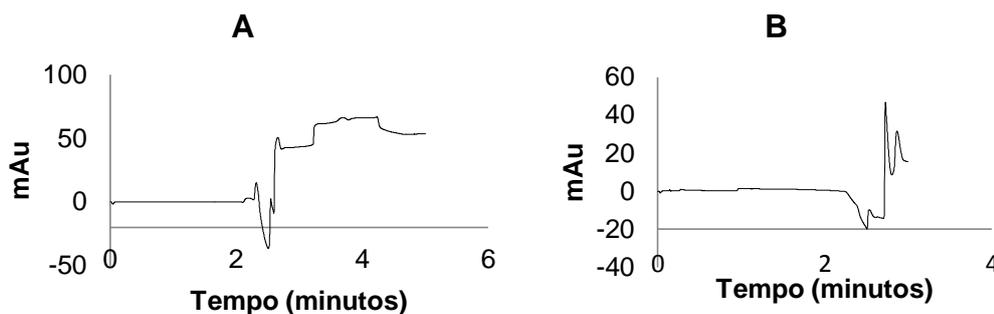


Figura 11: Eletroferogramas A e B correspondem à amostras sem padrão e amostras + padrão, respectivamente.

Condições operacionais: injeção de 10 segundos a 50 mbar, Voltagem aplicada de -15 kv, temperatura controlada no interior do cartucho de 25°C e detecção indireta em 210 nm. Eletrólito de corrida: 100mmol L⁻¹ TRIS, 50 mmol L⁻¹ HCl e 0,150 mmol L⁻¹.

5.1.2 Testes com centrifugação, diluição e filtragem

Foram realizados outros testes onde as amostras foram centrifugadas (5 min. a 6000 R.P.M., com força centrífuga relativa ou força gravitacional de 2350 x g), filtradas (filtro Milipore 0,45 µm) e diluídas em água nas proporções: 1:10; 1:25; 1:40; 1:50 e 1:75 (amostra:água).

Em seguida as amostras foram dopadas com padrões de nitrato e nitrito em concentrações conhecidas, desta vez os resultados foram melhores, porém os picos dos analitos ficaram coeluidos (juntos), dificultando a identificação de cada qual.

As condições eletroforéticas foram mantidas, porém o eletrólito de corrida foi trocado e vários testes foram feitos com diferentes constituintes e concentrações para compor o eletrólito de corrida.

A etapa de filtragem foi retirada, uma vez que testes mostraram diferenças estatísticas entre as amostras filtradas e as amostras que não foram filtradas, pois parte do nitrato (12,13%) estava ficando retido no filtro.

5.1.3 Testes com outros eletrólitos de corrida

a) Meio não aquoso (Metanol/Acetonitrila, TRIS-HCl)

Embora a simulação realizada no PEAKMASTER[®] (Figura 12) com o TRIS-HCl em meio não aquoso não tenha apresentado os resultados esperados, pois os analitos não separaram totalmente, os testes no equipamento se mostraram

satisfatórios para padrões, porém ao efetuarmos os testes com amostras de soro lácteo, não houve separação dos picos e apresentou muito ruído como detalha a Figura 13.

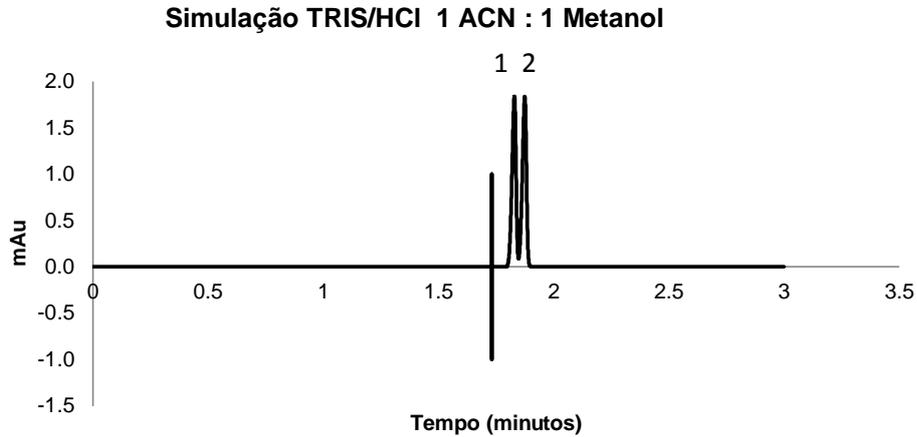


Figura 12: Eletroferograma de simulação de eletrólito de corrida TRIS/HCl em ACN/Metanol (1 :1). Os picos 1 e 2 correspondem ao NO_2^- e NO_3^- , respectivamente.

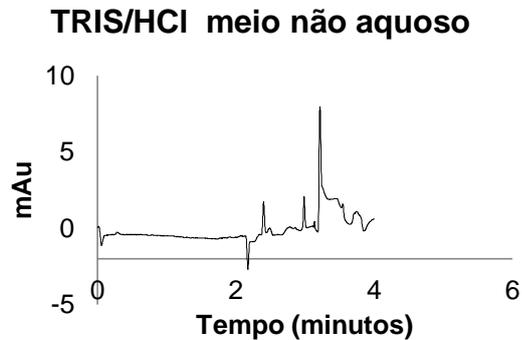


Figura 13: Eletroferograma TRIS/HCl em ACN/Metanol (1 :1).

Condições operacionais: injeção de 5 segundos a 50 mbar, Voltagem aplicada de -15 kv, temperatura controlada no interior do cartucho de 25°C e detecção indireta em 210 nm. Eletrólito de corrida: 100mmol L⁻¹ TRIS, 50 mmol L⁻¹ HCl e 1 ACN:1Metanol.

b) HIBA

As simulações com o HIBA no PEAKMASTER® apresentou resultados promissores (Figura 14), no entanto, na prática os resultados não foram satisfatórios uma vez que os analitos não foram separados como mostra a Figura 15, assim outros testes foram realizados.

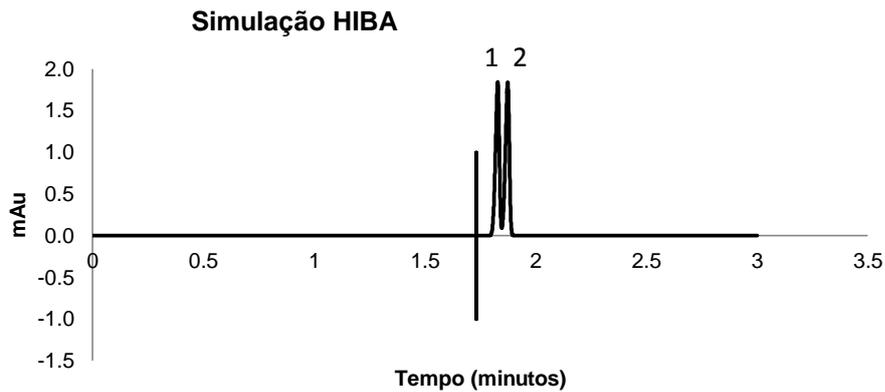


Figura 14: Eletroferograma de simulação de eletrólito de corrida com HIBA. Os picos 1 e 2 correspondem ao NO_2^- e NO_3^- , respectivamente.

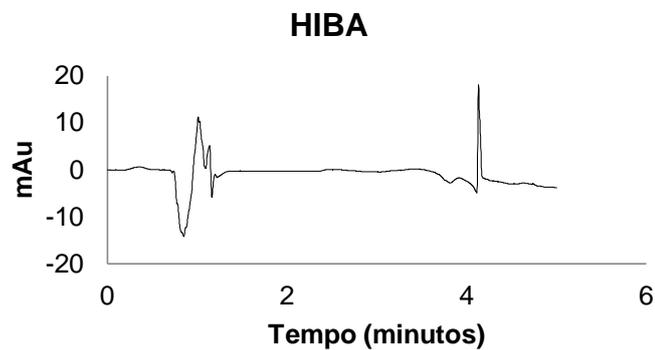


Figura 15: Eletroferograma HIBA. **Condições operacionais:** injeção de 5 segundos a 50 mbar, Voltagem aplicada de -15 kv, temperatura controlada no interior do cartucho de 25°C e detecção indireta em 210 nm. Eletrólito de corrida: 50mmol L⁻¹ TRIS, 65 mmol L⁻¹ HIBA e 0,150 mmol L⁻¹ CTAB.

c) Ácido Ftálico

Na simulação com o ácido ftálico houve comigração (Figura 16). Assim testes no equipamento foram realizados, comprovando a ineficiência do eletrólito, como detalha a Figura 17.

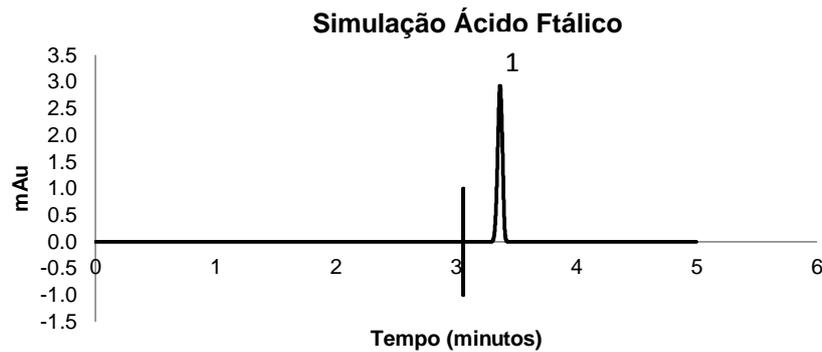


Figura 16: Electroferograma de simulação de eletrólito de corrida com ácido ftálico. O pico 1 corresponde a comigração do NO_2^- e NO_3^- .

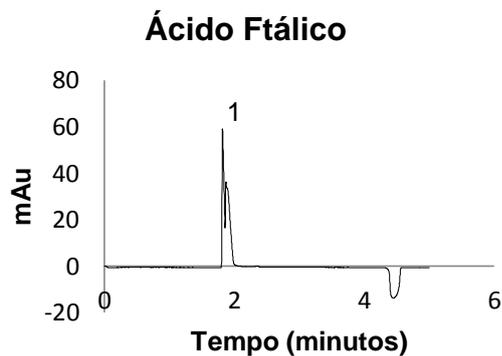


Figura 17: Electroferograma ácido ftálico. O pico 1 corresponde a comigração do NO_2^- e NO_3^- .

Condições operacionais: injeção de 5 segundos a 50 mbar, Voltagem aplicada de -15 kv, temperatura controlada no interior do cartucho de 25°C e detecção indireta em 210 nm. Eletrólito de corrida: 50mmol L⁻¹ TRIS, 35 mmol L⁻¹ ácido ftálico e 0,150 mmol L⁻¹ CTAB.

5.2 RESULTADOS OTIMIZADOS

A partir dos testes preliminares foi possível encontrar a melhor condição de análise, onde foram utilizadas as condições descritas na Figura 18, utilizando meio aquoso (o que tornou a técnica mais atraente, pois não há a utilização de solventes orgânicos) com a otimização de alguns parâmetros eletroforéticos. As amostras foram simplesmente centrifugadas (5 minutos a 6.000 R.P.M., com força centrífuga relativa ou força gravitacional de 2350 x g) e diluídas em água. Os resultados foram satisfatórios como exemplifica a Figura 18.

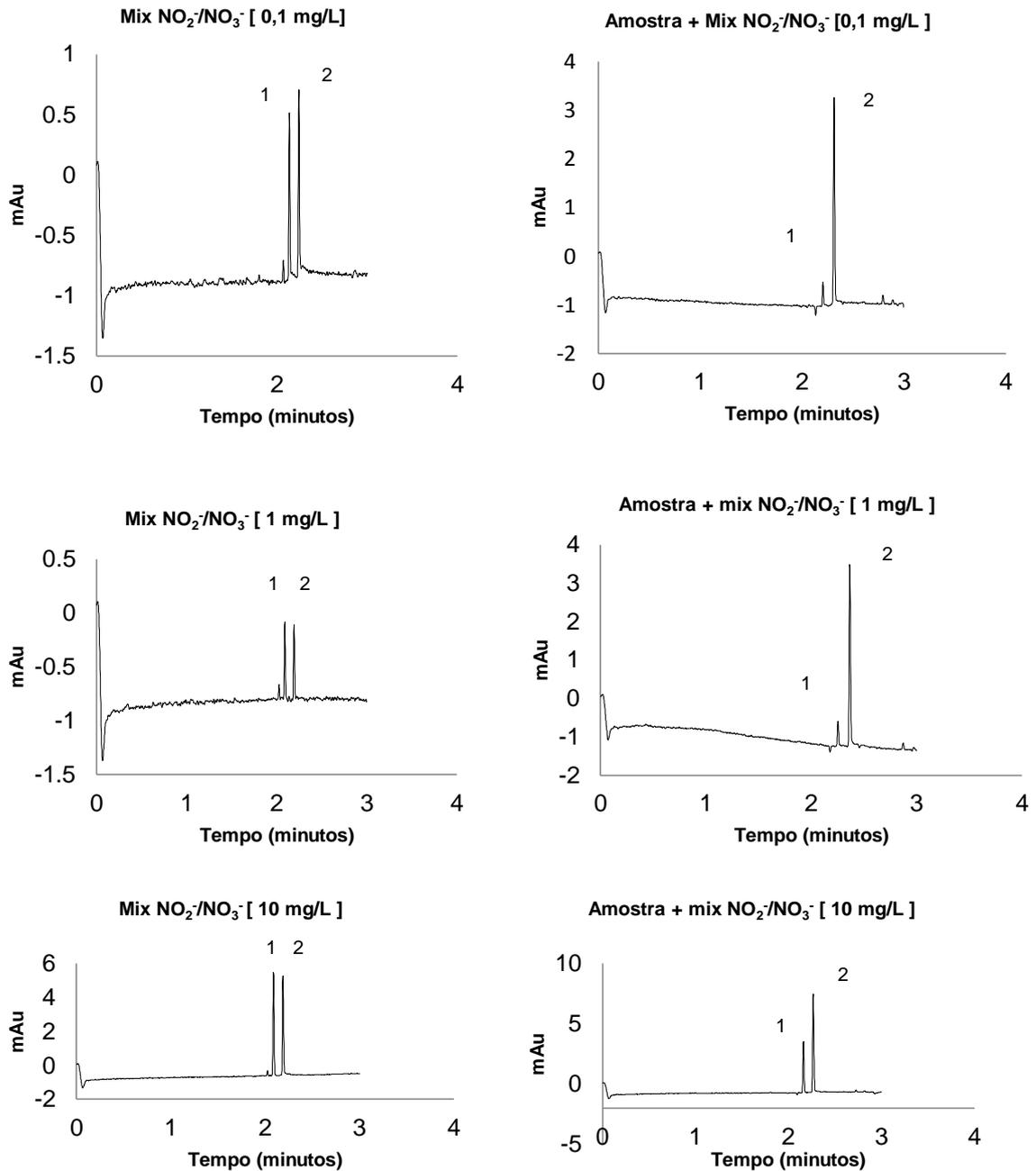


Figura 18: Eletroferogramas de padrões e amostra de soro lácteo com padrão nas concentrações 0,1; 1,0 e 10 mg/L de padrões NO₂⁻ e NO₃⁻. Os picos 1 e 2 correspondem ao NO₂⁻ e NO₃⁻, respectivamente.

Condições operacionais: injeção de 5 segundos a 50 mbar, Voltagem aplicada de -15 kv, temperatura controlada no interior do cartucho de 25°C e detecção indireta em 210 nm. Eletrólito de corrida: 100mmol L⁻¹ de TRIS, 50 mmol L⁻¹ de HCl e 0,150 mmol L⁻¹ de CTAB.

5.3 ESTUDO DA LINEARIDADE

Em testes preliminares foram construídas curvas analíticas com padrão NO_3^- , partir da concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, porém na faixa de $0,1$ a 1 mg L^{-1} , não houve linearidade, houve falta de ajuste e optou-se pela concentração de $1,0$ a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$.

As curvas analíticas (Figura 19) foram construídas através da injeção de padrão de NO_3^- em concentrações crescentes ($1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$) e analisadas nas condições analíticas otimizadas (item 5.2).

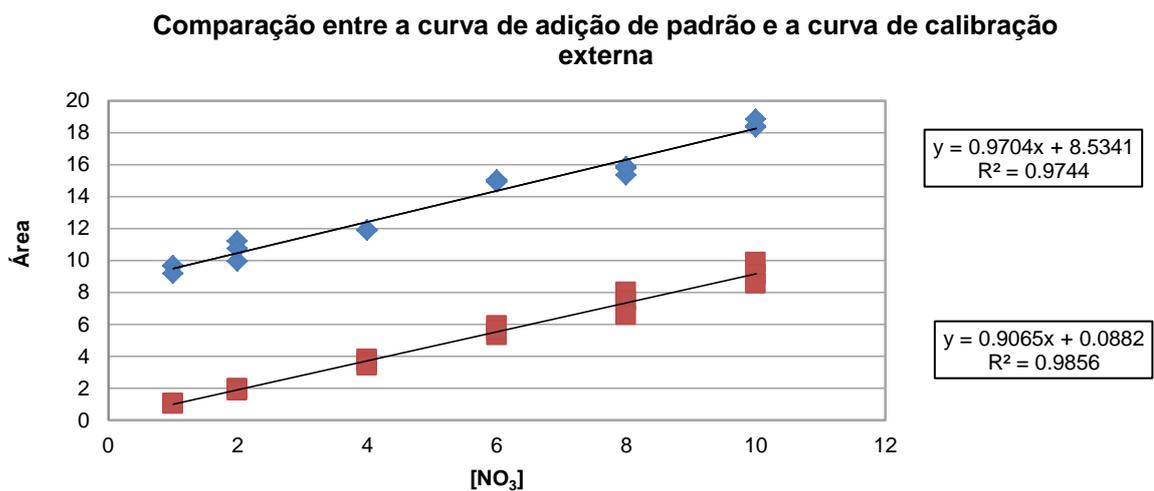


Figura 19: Comparação entre a curva de adição de padrão² e a curva de calibração externa³.

Onde: ■ Curva de calibração externa
◆ Curva de adição de padrão

A linearidade da resposta do detector do sistema de detecção foi verificada através da regressão linear dos dados das curvas analíticas.

Um coeficiente de correlação (r) maior que $0,999$ é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA (2003) e Ribani et al. (2004), recomendam um coeficiente de correlação igual ou superior a $0,99$. Logo, observa-se que os valores de r obtidos são menores que $0,99$, sugerindo que não existe uma resposta linear (não há uma relação direta sinal/concentração) do detector na faixa de $1,0$ a $10,0 \text{ mg/L}$ para os analitos estudados.

² **Curva de calibração externa:** é construída com os resultados analíticos obtidos pela análise do padrão em concentrações conhecidas adicionado a uma solução (geralmente água deionizada) ou amostra **isenta** do analito de interesse.

³ **Curva com adição de padrão:** é construída com os resultados analíticos obtidos pela análise do padrão em concentrações conhecidas adicionado a amostra **contendo** o analito de interesse.

5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ - SELETIVIDADE

A determinação de analitos em alimentos constitui-se um problema especial para a Química Analítica, visto que se deve determinar em níveis de traços, de microgramas (10^{-6}) a picogramas (10^{-12}), de uma determinada substância, seus metabólitos ou produtos de degradação, em presença de uma grande quantidade de material estranho, inerente da amostra.

A presença de todos esses compostos, analitos e componentes da matriz, podem interferir durante a análise eletroforética, influenciando na quantidade do analito que é transferido para a capilar. Esta interferência dos componentes da matriz, na quantificação dos analitos na análise eletroforética, é denominada de efeito de matriz (GONZALEZ et al., 2002). O efeito da matriz pode gerar sérios problemas analíticos, devido a possível superestimação da concentração dos analitos (ZROSTLÌKOVÁ et al., 2001) ou diminuição da resposta do detector de um analito presente no extrato da amostra comparado ao mesmo analito em solvente orgânico ou água deionizada (HAJŠLOVÁ et al., 1998; EURACHEM, 1998; BRUCE et al., 1998; ZROSTLÌKOVÁ et al., 2001, THOMPSON et al., 2002; CARDOSO et al., 2008).

Ao comparar as duas curvas (calibração externa e adição padrão) (Figura 19), pode-se inferir que houve efeito de matriz, impedindo que a metodologia alcançasse boa linearidade, assim foi necessária a utilização de condições de contorno. Tais condições podem envolver desde a modificação na forma de extração e limpeza da amostra até o emprego de um artifício conhecido como “curva de dois pontos”, sendo esta a forma escolhida para aprimorar a metodologia.

5.4.1 Condições de Contorno – “Curva de dois pontos”⁴

Devido à complexidade da amostra, observada pelo estudo da linearidade e consequente avaliação do efeito de matriz, a identificação dos analitos foi feita utilizando uma condição de contorno, conhecida como curva de dois pontos

⁴ **“Curva de dois pontos”:** A curva de calibração por de adição de padrão com dois pontos, é um caso particular da curva de calibração por de adição de padrão convencional. Ou seja, do ponto de vista conceitual e prático, a curva de calibração por adição de padrão com dois pontos leva em consideração um intervalo de nível de concentração compreendido entre a leitura da amostra (nível zero, ou seja, sem a adição de padrão) e a leitura do primeiro nível de concentração de padrão adicionado (primeiro nível de padrão adicionado), de maneira que a inclinação da curva de calibração por adição de padrão de dois pontos estaria contida na curva de calibração por adição de padrão convencional.

(SKOOG et al., 2006) onde são adicionadas às amostras, quantidades conhecidas de padrão e a análise é realizada com um conjunto de amostras mais as amostras com padrão e a quantificação é feita por meio da equação 13.

$$C_x = \frac{A_1 C_s V_s}{(A_2 - A_1) V_x} \quad (13)$$

Onde:

A_1 = área obtida pelo eletroferograma da amostra

A_2 = área obtida pelo eletroferograma da amostra + padrão

C_s = concentração da solução estoque

V_s = volume de padrão adicionado

V_x = volume da amostra adicionada

Oliveira et al., (2012) utilizaram esta condição de contorno para quantificação de NO_2^- e NO_3^- em amostras de água de córregos. Por serem amostras complexas e apresentarem efeito de matriz, os pesquisadores optaram por este artifício. Outra alternativa seria fazer uma nova curva de calibração para cada amostra analisada, o que tornaria a metodologia inviável. Assim, a “curva de dois pontos” calculada a partir da equação (13) possibilita maior frequência analítica e permite que os analitos presentes em amostras complexas sejam quantificados com confiabilidade dos resultados.

5.5 VERIFICAÇÃO DA FALTA DE AJUSTE

A análise dos dados utilizados para a confecção da curva de calibração externa mostrou que os dados seguem a distribuição normal através do coeficiente de correlação de Shapiro-Wilk. O coeficiente de correlação calculado (0,949) foi superior ao valor crítico estabelecido (0,923) com intervalo de confiança de 95%; não havendo razões para rejeitar a hipótese nula de que os dados seguem uma distribuição normal ($p > 0,05$).

Para avaliar a homogeneidade das variâncias dos resíduos foi realizado o teste de Cochran. Verificou-se que o valor de t encontrado (0,353) para o teste é inferior ao valor tabelado (0,478) e que a significância do teste (0,998) é superior a

0,05. Desta forma, a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos de regressão são constantes foi aceita, havendo homogeneidade entre as mesmas.

O teste F foi conduzido para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação da significância da regressão, o modelo não apresentou falta de ajuste entre a curva e os pontos experimentais, uma vez que F calculado (0,82) foi maior que o F tabelado (2,58).

Resultados similares foram encontrados para a curva de adição de padrão.

5.6 FIGURAS DE MÉRITO

5.6.1 Precisão (repetitividade), LD e LQ

Os resultados do coeficiente de variação (CV) obtidos para as amostras de soro lácteo variaram entre 0,28 e 0,36% (Tabela 8). Entretanto, esses valores demonstram repetitividade, uma vez que os coeficientes de variação se encontram abaixo do recomendado para amostras complexas. Segundo Ribani et al. (2004), são aceitáveis CV de até 2% para amostras complexas.

Tabela 8 - Desvio padrão (s) e coeficientes de variação (CV) obtidos após 30 (trinta) análises de uma mesma amostra de soro lácteo.

Amostra*	Desvio Padrão [#]	Coefficiente de Variação (%) [#]
A ₁	0,39	0,34
A ₂	0,47	0,28
A ₃	0,40	0,34
A ₄	0,48	0,29
A ₅	0,47	0,34
A ₆	0,42	0,30
A ₇	0,44	0,31
A ₈	0,50	0,36
A ₉	0,42	0,30
A ₁₀	0,47	0,34

*São 10 alíquotas (em triplicatas) de uma mesma amostra de soro lácteo.

[#] Média das triplicatas.

A precisão na faixa de trabalho é apresentada na forma de repetitividade (Tabela 9) sendo avaliado o coeficiente de variação dos resultados obtidos.

O método avaliado apresenta limite de detecção e quantificação inferior ao limite máximo de 30 mg/L, estabelecido no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do MAPA para soro lácteo (Brasil, 2014), estando assim de acordo com o propósito de aplicação do mesmo, conforme demonstrado na tabela 9.

Tabela 9: Resultados da exatidão e precisão do método, expressos em limite de repetitividade, recuperação média, LD e LQ.

Parâmetros de estudo	Resultados
Repetitividade (mg/L)	1,38
Recuperação Média (%)	99,54
LD (mg/L)	0,068
LQ (mg/L)	0,225

5.6.2 Exatidão (recuperação)

Foram obtidas recuperações de 98,55% a 100,22% (tabela 10), resultados que estão de acordo com o FDA (2007), que define como limites para recuperação do analito de 80% a 120%. Segundo GARP (1999), os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de matrizes complexas, geralmente estão entre 70% e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, quanto maior for a complexidade analítica e da amostra, este valor poderá ser de 50% a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$.

A exatidão do método está de acordo também com o estabelecido na Comunidade Europeia (2002), mesmo considerando o rigor desta norma, que é voltada à detecção e quantificação de contaminantes em alimentos. A mesma estabelece uma recuperação na faixa de 90% a 110% para que o método seja considerado exato.

Tabela 10 - Porcentagens de recuperação (% R), desvio padrão (s) e coeficientes de variação (CV) obtidos após 30 (trinta) análises em amostras de soro lácteo.

Amostra*	Recuperação (%) [#]	Desvio Padrão [#]	Coefficiente de Variação (%) [#]
A ₁	99,42	0,39	0,34
A ₂	99,53	0,47	0,28
A ₃	98,55	0,40	0,34
A ₄	98,61	0,48	0,29
A ₅	99,65	0,47	0,34
A ₆	99,47	0,42	0,30
A ₇	100,08	0,44	0,31
A ₈	100,05	0,50	0,36
A ₉	99,79	0,42	0,30
A ₁₀	100,22	0,47	0,34

*São 10 alíquotas (em triplicatas) de uma mesma amostra de soro lácteo.

[#] Média das triplicatas.

5.7 RESULTADOS DAS AMOSTRAS

Com a condição de contorno foi possível estimar a concentração de NO_3^- nas amostras de soro lácteo, conforme mostra a tabela 11.

Tabela 11: Resultados das concentrações de NO_2^- e NO_3^- presentes nas 13 (treze) diferentes amostras analisadas, quantidade adicionada ao leite e a % de NO_3^- arrastada para o soro lácteo.

Amostras*	NO_3^- no soro (mg/L)	NO_2^- no soro (mg/L)	Quantidade adicionada ao leite (mg/L) [#]	% arrastada para o soro lácteo
A	140,1	-	200	70,05
B	139,0	-	200	69,50
C	139,8	-	200	69,90
D	139,7	-	200	69,85
E	139,2	-	200	69,60
F	138,9	-	200	69,45
G	138,9	-	200	69,45
H	139,2	-	200	69,60
I	139,1	-	200	69,55
J	139,4	-	200	69,70
L	140,7	-	200	70,35
M	140,3	-	200	70,15
N	139,8	-	200	69,90

*São 13 (treze) diferentes amostras de soro lácteo.

[#]Quantidade de NO_3^- adicionada ao leite destinado à produção dos queijos dos quais obtivemos o soro lácteo.

Os resultados das amostras corroboram com o estudo realizado por Abreu e colaboradores (1986) onde adicionaram três níveis de NaNO_3 (nitrato de sódio), 10, 20 e 50 g/100L de leite, ao leite destinado à produção de queijos prato e observaram que a quantidade NO_3^- adicionada é diretamente proporcional a quantidade presente no queijo e à parcela arrastada pelo soro lácteo. Estimaram que em média, 70% do NO_3^- adicionado é difundida no soro lácteo, para o nível de 20 g/100L de leite, encontraram 143,406 mg/L com desvio padrão em torno da média de 0,637 mg/L, sendo esta a quantidade adotada como ideal para evitar o estufamento tardio.

Convém ressaltar que o NO_2^- , não foi identificado em nenhuma das amostras analisadas, acredito que pelo fato das amostras terem sido analisadas num período máximo de três dias após as coletas ou quando não foi possível as realizar as análises em curto tempo, as amostras foram congeladas, evitando a redução do NO_3^- à NO_2^- e talvez a quantidade presente estivesse abaixo do limite de detecção e quantificação do equipamento, não sendo possível a sua identificação. Porém, ainda assim, por adição de padrão, foi constatado que há separação dos analitos, caso seja necessário o método desenvolvido está apto a determinar simultaneamente os íons de NO_2^- e NO_3^- . Conforme mostra a Figura 20.

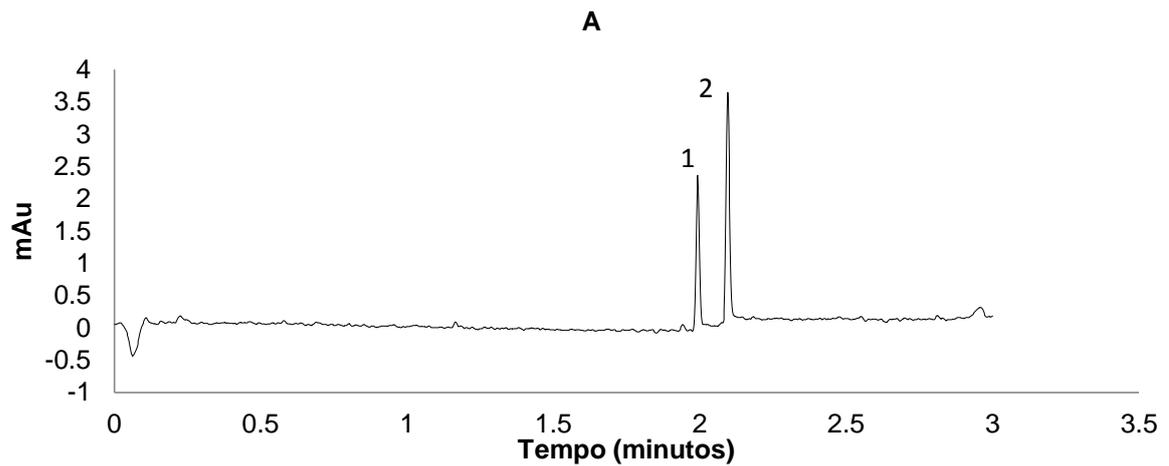


Figura 20: Eletroferograma de amostra de soro lácteo fortificada com 20 mg/L de padrões NO_2^- e NO_3^- . Os picos 1 e 2 correspondem ao NO_2^- e NO_3^- , respectivamente.

Condições operacionais: injeção de 5 segundos a 50 mbar, Voltagem aplicada de -15 kv, temperatura controlada no interior do cartucho de 25°C e detecção indireta em 210 nm. Eletrólito de corrida: 100mmol L^{-1} de TRIS, 50 mmol L^{-1} de HCl e 0,150 mmol L^{-1} de CTAB.

Os eletroferogramas das amostras reais de soro lácteo encontram-se representados na Figura 21.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho uma metodologia analítica simples, rápida e confiável para a identificação e quantificação simultânea dos íons de nitrito e nitrato em amostras de soro lácteo utilizando eletroforese capilar de zona, pode ser desenvolvida e otimizada.

O *software* PEAKMASTER[®] demonstrou ser uma importante ferramenta de simulação de parâmetros de eletrólitos de corrida e separação eletroforética, o que o torna extremamente útil no desenvolvimento de métodos por eletroforese capilar.

Embora a matriz soro lácteo tenha se mostrado um tanto complexa, as condições de contorno adotadas, possibilitou a viabilização do método de forma segura e precisa. Com os resultados, foi possível comprovar que o soro lácteo proveniente da produção de queijos nos quais há a necessidade de adicionar NaNO_3 durante a produção, apresenta cerca de 70% do NaNO_3 inicial, o que o torna menos atrativo para a indústria.

7 PERSPECTIVAS

Aplicar a metodologia desenvolvida neste estudo, em produtos acabados (derivados lácteos), como bebidas lácteas, soro em pó e até mesmo matrizes mais complexas como queijos.

Realizar estudos sobre a viabilidade de remoção do íon NO_3^- em amostras de soro lácteo, por meio de colunas de troca iônica e tecnologias de membranas.

Escrever, submeter e publicar o artigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ. Mercado nacional de lácteos. Disponível em: < <http://www.abiq.com.br/>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO/IEC 17025** – Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração, 2001.

ABREU, L. R., COSTA, L. C. G., FURTADO, M. M. Influência da adição de nitrato de sódio ao leite destinado a fabricação de queijo prato nos teores de nitrato e nitrito do soro e do queijo. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes**, v.41, n. 247, p. 35-36, 1986.

ALMEIDA K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características Físicas e Químicas de Bebidas Lácteas Fermentadas e Preparadas com Soro de Queijo Minas Frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.2, p.187-192, 2001.

ALTRIA, K. D. Ed. **Capillary Electrophoresis Guidebook**. Principles, instrumentation, operation and applications; Methods in Molecular Biology. Series 52; Series Editor J. M. Walker; Humana Press, 1995.

ANDRADE, R. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de nitrato, nitrito e N-nitrosaminas em produtos cárneos**. 2004. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. São Paulo: Ed. Manole, 2003, 142p.

ANUALPEC. Informa economics, FNP, South America, 2011. Disponível em: <<http://www.anualpec.com.br/>>. Acesso em: 21 mar. 2014.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**, 14th ed, Arlington, v. 2, n. 284, 1997.

ARDAN, T.; KOVACEVA, J.; CEJKOVÁ, J. Comparative histochemical and immunohistochemical study on xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase in mammalian corneal epithelium. **Acta Histochem**, v. 106, n. 1, p. 69–75, 2004.

BALDASSO, C. **Concentração e purificação das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BELLARDE, F. B. Elaboração de doce de leite pastoso com substituição parcial de sólidos do leite por concentrado proteico do soro. **Revista Uniara**, v. 1, n. 17-18, p. 249-255, 2006.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M.; Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.

BRANCO, S. M., ROCHA, A. A. Poluição, proteção e usos múltiplos de represas. São Paulo: CETESB, 1977. 185p.

BRASIL. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico da identidade dos queijos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, Página 3977.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.

_____. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento Técnico de identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 ago. 2005. Seção 1, p.7.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dezembro de 2006. Seção I, p. 8.

_____. Instrução Normativa n. 28, de 12 de junho de 2007. Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Composto Lácteo. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 jun. 2007. Seção 1, p. 8.

_____. Instrução Normativa n.º 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 dez. 2011.

_____. MAPA. Portaria nº 53, de 10 de abril de 2013. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Soro de Leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 abr. 2013. Seção 1. Consulta Pública encerrada em 10 mai. 2013.

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. Composição do leite. 2006. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em: 23 set. 2013.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim Acta**, 128: 93-106, 1998.

BRUNING-FANN, C. S.; KANEENE, J. B. The effects of nitrate, nitrite, and n-nitroso compounds on human health: a review. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 35, p. 521-538, 1993.

BUTT, S.B.; RIAZ M.; IQBAL, M.Z. Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair liquid chromatography. **Talanta**, v. 55, n. 4, p. 789-797, 2001.

CARDOSO, M. H. W. M.; NOBREGA, A. W.; ABRANTES, S. Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso em tomates, **Revista Analytica**, n.34, p. 48-55, 2008.

CARTA LEITE. **Aumenta o consumo de queijo no Brasil**. Scot Consultoria. Ano 6, ed. 105, Set. 2010.

CHAVES, K. F.; CALLEGARO, E. D.; SILVA, V. R. O. Utilização do soro de leite nas indústrias de laticínios da região de Rio Pomba-MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 27., 2010, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2010.

COMUNIDADES EUROPEIAS. Comissão das Comunidades Europeias. Conselho. Directiva 657, de 2002. Da execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. Bruxelas, 17 ago. 2002. L221. p. 8-36.

CORNÉE, J.; LAIRON, D. VELEMA, J.; GUYADER, M.; BERTHEZENE, P. An estimate of nitrate, nitrite and N-nitrosodimethylamine concentrations in French food products of food groups. **Sciences Des Aliments**, v.12, v.155-197, 1992.

COSS, A.; CANTOR, K. P; REIF, J. S.; LYNCH, C. F.; WARD, M. H. Pancreatic Cancer and Drinking Water and Dietary Sources of Nitrate and Nitrite. **American Journal of Epidemiology**, v.159, n.7, p.693-701, 2004.

COSTA, R. G. B. Juiz de Fora: ILCT-EPAMIG, 2013. **Fotografias de queijo prato bola evidenciando o estufamento tardio**, color.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Analytica Chimica Acta**, Amsterdã, v. 391, p. 105-126, 1999.

DAIRY PROCESSING HANDBOOK. Gösta Bylund. Lund, Sweden: Ed. Tetra Pak Processing Systems AB, 1995. 1 CD ROOM.

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS – USDA. Disponível em:<<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

DEVOYOD, J. J. L' emploi des nitrates dans la fabrication des fromages. **Annales de la nutrition et de l'alimentation**, v.30, n. 5/6, p.789-792, 1976.

DI MATTEO, V.; ESPOSITO, E. Methods for determination of nitrite by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of chromatography A**, v. 789, p. 213-219, 1997.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 3ed. Wiley. 1998.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S .I.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A. Characterization of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, v. 112, p .929-935, 2009.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. **Biometrika**, v. 38, p. 159-178, 1951.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <www.alibra.com.br>. Acesso em: 25 nov. 2013.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics**. Teddington. 1998. Disponível em: <<http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf>> Acesso em: 13 out. 2013.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Ora Laboratory Procedure**. Methods, method verification. Rockville, 2007. Disponível em: <<http://web.ora.fda.gov/dfs/policies/manuals/default.html>>. Acesso em: 03 out. 2013.

FANQUIN, V.; ANDRADE, A. T. **Nutrição mineral e diagnose do estado nutricional de hortaliças**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004.

FAO/WHO. Food Additives Series nº 35. **Toxicological Evaluation of Certain Food Additives**. Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, Geneva, 1996.

_____. Food Additives Series nº 50. **Safety Evaluation of Certain Food Additives**. Fifty-ninth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, Geneva, 2003.

FOSCHIERA, J. L. Indústria de laticínios – **Industrialização do leite, análises, produção de derivados**. Porto Alegre: Suliani Editografia Ltda. 2004.

FOX, J. B. The determination of nitrite: a critical review. **CRC Critical Reviews. Analytical Chemistry**, v.15, n.3, p. 283-313, 1983.

FREITAS FILHO, J. R. F.; SOUZA FILHO, J. S.; OLIVEIRA, H. B.; ANGELO, J. H. B.; BEZERRA, J. D. C. Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. **Revista eletrônica de extensão – Extensio**, Universidade Federal de Santa Catarina. v. 6, n. 8, p.35-49, 2009.

FURLANI, P. R.; COMETTI, N. N. Segurança alimentar e produtos hidropônicos. Disponível em: <http://www.labhidro.cca.ufsc.br/seguranca_alimentar_NITRATO.htm> Acesso em: 12 fev. 2014.

FURTADO, M. M. O estufamento tardio dos queijos: características e prevenção - uma revisão. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v.40, n. 242, p. 3-39, 1985.

_____. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1999, 176p.

_____. **Queijos com olhaduras**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2007, 179p.

GALESLOOT, T. E. Effect of nitrate in preventing butyric acid fermentation in cheese. **Neth Milk Dairy J**, v.15, p. 395-410, 1961.

GARP - GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. Manual de resíduos de pesticidas em alimentos. (apostila), 1999.

GEFFNER, M. E.; POWARS, D. R.; CHOCTAW, W. T., Acquired methemoglobinemia. **The Western Journal of Medicine**, v. 134, n. 1, p. 7-10, 1981.

GERVASIO, A. P. G.; LAVORANTE, A. F.; MORAES, M. C. B.; GINE, M. F. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especificação. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 65-74, 2003.

GONÇALVES FILHO, L. C. **Determinação de glicerina livre e total em biodiesel por eletroforese capilar**. 2007. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química) – Centro de ciências físicas e matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

GONZALEZ, F. J. E.; TORRES, M. E. H.; LOPEZ, E. A.; CUADROS-RODRIGUEZ, L.; VIDALA, J.L.M. Matrix-effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis. **Journal of Chromatography A**, n. 966, p. 155-165, 2002.

GOODHEAD, K.; GOUGH, T. A.; WEBB, K. S.; STADHOUDERS, J.; ELGERSMA, R. H. C. The use of nitrate in the manufacture of Gouda cheese. Lack of evidence of nitrosamine formation. **Neth Milk Dairy J**. v. 30, p. 207-221, 1976.

HAJŠLOVÁ, J.; HOLADOVÁ, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPŇÝ, M. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, n. 800, p. 283-295, 1998.

HAYES, M. A.; EWING, A. G. Electroosmotic flow control and monitoring with an applied radial voltage for Capillary Zone Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 512-516, 1992.

HEIGER, D. **High performance capillary electrophoresis : An introduction**. Germany: Agilent Technologies, 2000.

HELLER, M. **Eletroforese capilar aplicada ao estudo de adulterações em amostras de uísques**. 2010. 93f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

HILL, M. J. Nitrite toxicity: myth or reality? **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 5, p. 343-344, 1999.

HOLSINGER, V. H.; POSATI, L. P.; DEVILBISS, E. D. Whey beverages: A review. **Journal of Dairy Science**, v. 57, p. 849-859, 1974.

HORWITZ W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure Appl Chem**, v. 67, p. 331-343, 1995.

HOTCHKISS, J. H.; HELSER, M. A.; MARAGOS, C. M.; WENG, Y. M. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. Food Safety and Biological Implications. ASC Symposium Series 484, Washington, DC, 1992.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Nacional**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 19 jan. 2014.

INSTITUTUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Aspectos das Importações de Soro de Leite no Brasil. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v. 8, n. 7, 2013.

JIMIDAR, M. Electromigration methods: origins, principles and applications. In: S. Ahuja e N. Jespersen (ed), **Comprehensive Analytical Chemistry**. v. 47, p. 572-623, 2006.

JOHNS, K. F.; BREADMORE, M. C.; BRUNO R.; HADDAD P. R. Evaluation of Peakmaster[®] for computeraided multivariate optimisation of a CE separation of 17 antipsychotic drugs using minimal experimental data. **Electrophoresis**, v. 30, p. 839-847, 2009.

JORGENSON, J. W.; LUKACS, K. D., "Zone Electrophoresis in Open-tubular Glass Capillaries", **Anal. Chem.**, v. 53, n. 1298, 1981.

JUDGE, M. D.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C. **Principles of Meat Science**. 3a ed. Published by Kendall/Hunt Publishing Co., 1989, 351 p.

KIANG, C. H.; KUAN, S. S.; GUIBAULT, G. G. Enzymatic determination of nitrate: Electrochemical detection after reduction with nitrate reductase and nitrite reductase. **Analytical Chemistry**, v. 50, n. 9, p.1319-1322, 1978.

KINKARTZ, S. Crescimento populacional e o desafio da alimentação. Laboratório de Demografia e Estudos Populacionais – UFJF. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/ladem/2012/02/28/crescimento-populacional-e-o-desafio-da-alimentacao-por-sabine-kinkartz/>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

KIRBY, B. J.; HASSELBRINK JR, E. F. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. **Electrophoresis**, v. 25, p. 187-202, 2004

KOSIKOWSKI, F. U. Whey utilization and whey products. **Journal of Dairy Science**, v.62, p.1149-1160, 1979.

LÁCTEA BRASIL. **Queijo: alimento nobre e saudável**. Disponível em <http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/lactea_brasil_queijos.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2014.

LANDERS J. P. **Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 3 ed. Nova York: CRC Press, 2008. 1598p.

LIMA, M. J. R.; FERNANDES, S. M. V.; RANGEL, A. O. S. S. Determination of nitrate and nitrite in dairy samples by sequential injection using an in-line cadmium-reducing column. **International Dairy Journal**, v.16, n. 6, p. 1442-1447, 2006.

LINK, W. **Tópicos Avançados da Metrologia Mecânica**. Rio de Janeiro, Editora da Mitutoyo Sul América Ltda, 2000. 263 p.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia**. 2. ed. São Paulo: Medsi, 1999.

LUNDBERG, J. O.; GOVONI, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 3, p. 395-400, 2004.

MACHADO, R. M. G; FREIRE, V. H.; SILVA, P. C.; FIGUERÊDO, D. V.; FERREIRA, P. E. **Controle ambiental nas pequenas e médias indústrias de laticínios**. Projeto Minas Ambiente, Belo Horizonte, 2002, 224p.

MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENTE, J. M.; Manual de indústrias de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 1995. 600p.

MAGANHA, M. F. B. **Guia técnico ambiental da indústria de produtos lácteos**. São Paulo: CETESB, 2006, 95p. (1 CD).

MANEA, F.; REMES, A.; RADOVAN, C.; PODE, R.; PICKEN, S.; SCHOONMAN, J.; Simultaneous electrochemical determination of nitrate and nitrite in aqueous solution using Ag-doped zeolite-expanded graphite-epoxy electrode. **Talanta**, 2010, v. 83, n. 1, p. 66-71, 2010.

MARTINS, D. I.; MÍDIO, A. F. **Toxicologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2000.

MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, A. N.; BORGES, G. T.; NICOLAU, E. S.; SOUZA, A. A. G. Estudo quali-quantitativo da microbiota anaeróbia em Amostras de queijos provolone, parmesão e prato. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 27-34, 2001.

MICROSOFT EXCEL[®] for Windows, 2010, Versão 14.0: **Microsoft Corporation**[®], 2010. Conjunto de programas. 1 DVD Room.

MILKPOINT. Estatísticas. Disponível em:
<http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/Expotacoes_Brasileiras.htm> Acesso em: 15 out. 2013.

MIKUSKA, P.; VECERA, Z., Simultaneous determination of nitrite and nitrate in water by chemiluminescent flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 495, n.1-2, p. 225-232, 2003.

MIZUBUTI, I. Y. Soro de Leite: Composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, n. 1, p. 80-94, 1994.

MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v. 54, p. 785-803, 2001.

MOURZINA, Y. G.; ERMOLENKO, Y. E.; YOSHINOBU, T.; VLASOV, Y.; IWASAKI H.; SCHÖNING, M. J. Anion-selective light-addressable potentiometric sensors (LAPS) for the determination of nitrate and sulphate ions. **Sensor and Actuators B: Chemical**, v. 91, n.1-3, p. 32-38, 2003.

MURRAY, K. D.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Haper: Bioquímica**, 8.ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

NEVES, B. S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: Embrapa gado de leite. **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar**, p.97-108, 2001.

NOLLET, L. M. L. **Handbook of Water Analysis**, 2. ed., New York: Marcel Dekker, 2000.

OLIVEIRA, C. P.; GLÓRIA, M. B. A.; BARBOUR, J. F.; SCANLAN, R. A.; Nitrate, nitrite, and volatile nitrosamines in whey-containing food products. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.43, n. 4, p. 967-969, 1995.

OLIVEIRA, M. A. L.; SOARES, D. C.; TOSTES, G. S.; GUIMARÃES, M. C.; VAZ, F. A. S. Optimization of an Alternative Methodology for Simultaneous Analysis of Nitrite and Nitrate in Water from Urban Stream by Capillary Electrophoresis under Direct UV Detection. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 484-490, 2012.

OLMEDO, R.G. ; BOSCH, N.B. Aspectos Toxicológicos de la presencia de nitratos y nitritos en los productos hortícolas cocidos y en su agua de cocción. **Alimentaria**, v.25, n.191, p.71-75, 1988.

PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos do soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005.

PAGNO, C. H.; BALDASSO, C.; TESSARO, I. C.; FLORES, S. H.; JONG, E. V. Obtention of whey protein and characterization of its technological functional properties. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 2, p. 231-239, 2009.

PAULA, J. C. J. **Elaboração e estabilidade de bebida carbonatada aromatizada à base de soro de leite**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.

PEAKMASTER® by **JAROS, M.; STEDRY, M.; HRUSKA, V.; ZUSKOVA, I.; GAS, B.** 2011, versão 5.3: 2011. 1 DVD Room.

PEREDA, J. A. O.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D, G, F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos**. V.2. Traduzido por Fátima Murrad. Porto Alegre: Artmed. 2005, 279 p.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

POPPI, F. A.; COSTA, M. R.; DE RENSIS, C. M. V. B.; SIVIERI, K. Soro de Leite e Suas Proteínas: Composição e Atividade Funcional. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 2, p. 31-37, 2010.

PORTO, L. M.; SANTOS, R.C.; MIRANDA, T.L.S. Determinação das melhores condições operacionais no processo de produção de ricota. **Boletim CEPPA**, v. 23, n.1, p.173-182, 2005.

PURVES, W. K.; SADAVA, D.; ORIAN, G. H.; HELLER, H. C. **Life, The Science of Biology**, 6. ed. Sinauer e Freeman, Massachusetts, USA, 2001. 1044 p.

REIS, J. S.; MIYAGI, E. S.; CHANDELIER, R. A.; BERGAMASCO, A. F.; LOBATO, V.; MOURA, C. J. Fabricação de derivados do leite como uma alternativa de renda ao produtor rural. **Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras**, Lavras, v.49, p. 1-38, 2002.

REIS, P. B. **Validação de método espectrofotométrico para determinação de nitrito em patê de presunto**. 2006. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICHARDS, N. S. P. S. Soro lácteo: perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Food Ingredients**, v. 3, n. 17, p. 20-27, 2002.

ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Capillary Electrophoresis and electrochromatography**. Chemical Analysis: Modern Instrumentation, methods and techniques, p. 147, 2007.

RYAN, T. A.; JOINER, B. L. **Normal probability plots and tests for normality**. The State College: Pennsylvania State University, 1976.

SANCHES, P. J. S. T.; ZANIN, K. D.; CAMARÃO, E. B.; GARCIA, R. C.; RIOS, A.; VALCARCEL, M. Pré concentração de nitrosaminas a partir de amostras aquosas por extração em fase sólida e cromatografia capilar eletrocínética micelar. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p.193-196, 2003.

SANTANA, A. K. M.; NUNES, L. C. C.; MEDEIROS, F. P. M.; SILVA, M. J.; LAVRA, Z. M. M. ROLIM NETO, P. J. Otimização e validação do método analítico volumétrico para quantificação do carbonato de cálcio. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 28, p. 177-183, 2007.

SANTOS, J.; BECK, L.; WALTER, M.; SOBCZAK, M.; OLIVO, C.J.; COSTABEBER, I.; EMANUELLI, T. Nitrato e nitrito em leite produzido em sistema convencional e orgânico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 304-309, 2005.

SCHWER, C.; KENNDLER, E. Electrophoresis in fused-silica capillaries: the influence of organic solvents on the electroosmotic velocity and the potential zeta. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 1801-1807, 1991.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SILVA, P. **Farmacologia**, 5. ed., Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1998.

SILVA, J. A. F.; CARRILHO, E.; COLTRO, W. K. T.; TAVARES, M. F. M.; Terminologia para as Técnicas Analíticas de Eletromigração em Capilares. **Química Nova**, v. 30, p. 740-744, 2007.

SILVEIRA, P. R.; ABREU, L. R. Rendimento e composição físico-química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção direta de vapor. **Ciências Agrotécnicas**, v. 27, n. 6, p. 1340-1347, 2003.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana. São Paulo: Thomson, 2006, 1026p.

SMITH, L. L. Overtraining, excessive exercise and altered immunity: Is This a THelper-1 Versus T Helper-2 Lymphocyte Response? **Sports Medicine**, Texas, v. 33, n. 5, p. 347- 364, 2003.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins - From 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 695-704, 2008.

SOARES, T. F. L. **Remoção de carga orgânica afluyente à ETAR de Tolosa por coagulação-floculação química**. Lisboa, 2009. 131 pág. Disponível em: < http://run.unl.pt/bitstream/10362/2361/1/Soares_2009.pdf >. Acesso em: 22 de agosto de 2013.

STATISTICAL PACKAGE FOR SOCIAL SCIENCE (SPSS®), 2013, versão 22.0: **IBM**®, 2013. 1 DVD Room.

St. CLAIRE, R. L.; R. L. Fundamental Reviews. **Analytical Chemistry**. V. 68, 1996, 569p.

TAVARES, M. F. M.; Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, v.19, p. 173-181, 1996.

_____. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 5, p. 493-511, 1997a.

_____. ; COLOMBARA, R.; MASSARO, S. Modified electroosmotic flow by cationic surfactant additives in capillary electrophoresis - Evaluation of electrolyte systems for anion analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 772, n. 1-2, p. 171-178, 1997b.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R.; Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure appl. Chem**. V. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

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

USHER, C. D., TELLING, G. M. Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: A critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.26, p. 1793-1805, 1975.

VALSECHI, O. A. **O leite e seus derivados**. Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de tecnologia agroindustrial e socioeconômica rural. Araras, SP, 2001, 35 p.

WALKER, R. Naturally occurring nitrate / nitrite in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 26, n. 11, p. 1735-1742, 1975.

WALTERS, C. L. Reactions of nitrate and nitrite in foods with special reference to the determination of N-nitroso compounds. **Food Additives and Contaminants**, v. 9, n. 5, p. 441-447, 1992.

WARD, M. H.; DEKOK, T. M.; LEVALLOIS, P.; BRENDER, J.; GULIS, G.; NOLAN, B. T.; VANDERSLICE, J. Drinking-water nitrate and health - recent findings and research needs. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 11, p. 1608-1614, 2005.

WESTON, A.; BROWN, P. **HPLC and CE [electronic resource]: principles and practice**. San Diego: Academic Press, 1997.

YANG, G. C. C.; LEE, H. L. Chemical reduction of nitrate by nanosized iron: kinetics and pathways. **Water Research**, v. 39, p. 884–894, 2005.

YUE, X.; ZHANG, Z.; YAN, H. Flow injection catalytic spectrophotometric simultaneous determination of nitrite and nitrate. **Talanta**, v. 62, n.1, p. 97-101, 2004.

ZACARCHENCO, P. B.; SILVA, R. P.; BUENO, C. R. F.; AMARAL, A. M. P. Tecnologias para industrialização do soro de leite. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 12., 2013, Porto Velho. **Anais...** Porto Velho: EMBRAPA Rondônia, 2013.

ZEMAN, C.L.; KROSS, B.; VLAD, M., A nested case-control study of methemoglobinemia risk factors in children of Transylvania, Romania. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n.8, p. 817-822, 2002.

ZROSTLÍKOVÁ, J.; HAJŠLOVÁ, J.; GODULA, M.; MAŠTOVSKÁ. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, n. 937, v. (1-2), p. 73-86, 2001.