

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Desenvolvimento de metodologia alternativa
limpa para análise de nitrito**

Sahra Cavalcante Lemos

Dissertação de Mestrado

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SAHRA CAVALCANTE LEMOS

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
ALTERNATIVA
LIMPA PARA ANÁLISE DE NITRITO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof. Dra. Helena Redigolo Pezza

Araraquara
2008

DADOS CURRICULARES

1. Formação Acadêmica

1.1. Graduação

Bacharelado em Química

Universidade Federal de Mato Grosso

Período: 2002 a 2006

1.2. Pós-Graduação

Mestrado em Química Analítica

Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Período: 2006 a 2008

2. Trabalhos apresentados em Congresso

LEMOS, S. C.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determinação de nitrito em águas superficiais por espectroscopia de reflectância difusa. In: 14º ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 2007, João Pessoa. EP057.

3. Artigo aceito para publicação

SANTINI, A. O.; LEMOS, S. C.; PEZZA, H. R.; CARLONI-FILHO, J.; PEZZA, L. Development of a potentiometric sensor for the determination of saccharin in instant tea powders, diet soft drinks and strawberry dietetic jam. Microchemical Journal. DOI: 10.1016/j.microc.2008.04.006. Aceito em 25 de abril de 2008.

4. Artigos enviados

GASPARINI, F.; WEINERT, P. L.; LEMOS, S. C.; PEZZA, L. PEZZA, H. R. A simple and green analytical method for formaldehyde determination. Journal of Brazilian Chemical Society.

LIMA, L. S.; WEINERT, P. L.; LEMOS, S. C.; SEQUINI, R.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. A environmental friendly reflectometric method for ranitidine determination in pharmaceuticals and urine. *Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Olga e Ajuricaba,

Por terem lutado muito para que eu
pudesse chegar até aqui;

Às minhas irmãs, Manoela e Calíope,

Por serem meus maiores exemplos de força
e determinação;

Aos meus sobrinhos, Ártemis e Lucas,

Pelo infinito carinho e por me encherem de
esperança nos momentos difíceis;

Ao meu namorado, Laudemir,

Por ter aparecido em minha vida para me
fazer muito mais feliz, pelo carinho, incentivo
e amor;

A Deus,

Por me carregar no colo quando não
tenho forças para caminhar.

AGRADEÇO...

Ao CNPq pela bolsa de mestrado;

À Prof^a Helena Redigolo Pezza pela orientação, paciência e preocupação em me ajudar em qualquer momento difícil, sempre com muita disposição;

Ao Prof. Leonardo Pezza pela amizade e cooperação;

Aos membros da banca examinadora pela atenção e avaliação crítica deste trabalho;

Ao Prof. Massao Ionashiro por todos os ensinamentos, incentivo e amizade;

À Sandra pelo tratamento dos resíduos gerados durante o desenvolvimento deste trabalho e pelos ótimos conselhos, sempre dados com bastante amor;

Aos amigos do laboratório Fritz Feigl, Liliane, Patrícia Los, Fabrícia, Aline, Mara, Leonardo, Laura, Zé Rufino, Fernanda, Marcão e Thiago pela sincera amizade;

Aos amigos do laboratório LATIG, Cláudio, Adriano, Patrícia Dametto, Beatriz e Elias;

Aos amigos Marcos e Adriano por terem me recebido carinhosamente quando cheguei a Araraquara e por me apresentarem ao Instituto de Química;

Às minhas amigas Mônica, Paloma, Luana, Camila, Érica e Jussara.

A todos os funcionários do Instituto de Química por nos atenderem sempre com bastante presteza e competência.

...MUITO OBRIGADA!!!!

RESUMO

O presente trabalho propõe um novo método para análise de nitrito em amostras de águas naturais e alimentos, por espectroscopia de reflectância difusa combinada com *spot test*. Neste método, a reação de interesse é procedida em papel de filtro, por meio da adição de 30 μL da solução do reagente cromogênico, seguida da adição de 30 μL da solução de analito. A intensidade da coloração do produto é medida por reflectância difusa, em 532 nm. O desenvolvimento do método passou por uma etapa de planejamento experimental, que permitiu encontrar as concentrações ótimas dos reagentes, para as quais a sensibilidade do método é maior ($9,60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o dicloridrato de naftiletilenodiamina e $5,90 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para o ácido sulfanílico). O reagente cromogênico foi preparado misturando-se os dois compostos em uma mesma solução, juntamente com ácido clorídrico, na concentração de $6,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Uma relação linear ($r = 0,997$) foi observada na faixa entre $2,90 \times 10^{-4}$ e $1,74 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ânions nitrito, representando os valores de reflectância obtidos versus o logaritmo da concentração de nitrito. Com o objetivo de trabalhar com quantidades ainda menores do analito, as concentrações dos reagentes cromogênicos foram reduzidas pela metade, exceto a do ácido clorídrico, que permaneceu constante, e uma segunda curva analítica ($r = 0,997$) foi construída na faixa entre $7,17 \times 10^{-6}$ e $4,35 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de íons nitrito, representando-se graficamente os valores de reflectância obtidos versus a concentração de analito presente nas soluções. O produto colorido mostrou uma estabilidade óptica de pelo menos 50 minutos em atmosfera ambiente e de três dias, se mantido em dessecador com atmosfera de nitrogênio. O método apresentou bons valores de precisão intradia e interdia, com RSD iguais a 1,51% e 2,01% respectivamente, e foi aplicado à análise de duas amostras de águas naturais e a uma amostra de salsicha. Os resultados foram comparados com os obtidos pelos métodos oficiais,

mostrando concordância em ambos os casos em relação à precisão e a exatidão. O método desenvolvido apresentou certas vantagens frente a outras metodologias, tais como rapidez, simplicidade, baixo consumo de reagentes e geração mínima de resíduos, sendo, portanto, um método ambientalmente amigável, de acordo os princípios estabelecidos pela Química Verde.

Palavras-chave: espectroscopia de reflectância difusa, nitrito, águas naturais, salsicha.

ABSTRACT

This work proposes a new method for nitrite determination in natural waters and foodstuff samples by diffuse reflectance spectroscopy combined with spot tests. In this method, the reaction occurs on the surface of a filter paper. Firstly 30 μL of the chromogenic reagent solution were added to the paper, followed by 30 μL of sample solution. The intensity of the color of the reaction product is measured by diffuse reflectance, at 532 nm. Experimental design was employed for the development of this method and the optimized reagent concentrations found were $9.60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ for N-(1-naphthyl)ethylenediamine hydrochloride and $5.90 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ for sulfanilic acid. The chromogenic solution was composed by the mixture of both reagents with HCl $6.00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, in deionized water. A linear relationship ($r = 0.997$) was observed in the concentration range of 2.90×10^{-4} to $1.74 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ of nitrite, by plotting reflectance values versus the logarithm of nitrite concentration in the standard solutions. In order to work with lower quantities of nitrite, the concentrations of sulfanilic acid and N-(1-naphthyl)ethylenediamine hydrochloride were diluted to a half of the concentrations proposed by the experimental design. The calibration curve constructed under these conditions showed a linear relationship ($r = 0.997$) ranging from 7.17×10^{-6} to $4.35 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ of nitrite ions, by plotting reflectance values versus the concentration of nitrite standard solutions. The colored product had an optical stability of at least 50 minutes in ambient conditions and of three days when kept under nitrogen atmosphere. In the investigation of intraday and interday precision, the RSD values obtained were 1.51% and 2.01%, respectively. The new method was applied to the analysis of two samples of natural waters and one sausage sample. The results obtained

by the proposed method were compared with the ones obtained by the official methods of analysis and they were in agreement in relation to precision and accuracy. The new methodology showed some advantages such as rapidity, simplicity, low consumption of reagents and minimum waste generation. Therefore, it is an environmental friendly method, which is in accordance with Green Chemistry principles.

Key-words: diffuse reflectance spectroscopy, nitrite, natural waters, sausages.

Lista de Ilustrações

- FIGURA 1.** FORMAÇÃO DE METAEMOGLOBINA PELO NITRITO E SUA CONVERSÃO À HEMOGLOBINA ¹¹ 20
- FIGURA 2.** VISTA SUPERIOR DO ACESSÓRIO DE REFLECTÂNCIA LABSPHERE MODELO RSA-HP-53. FONTE: LABSPHERE. *RSA-HP-53 INSTRUCTION MANUAL*. NORTH SUTTON, [1999]. P. 4. 41
- FIGURA 3.** SUPORTE UTILIZADO NA REALIZAÇÃO DOS *SPOT TESTS* (BASEADO EM: TUBINO; ROSSI; MAGALHÃES, 1997)..... 50
- FIGURA 4.** ESPECTRO DE REFLECTÂNCIA DA REAÇÃO DE *SPOT TEST* NO PAPEL DE FILTRO ENTRE NITRITO, NAFTILETILENODIAMINA E ÁCIDO SULFANÍLICO EM MEIO ÁCIDO. VALORES DE A_R FORAM OBTIDOS APÓS O PAPEL SECAR AO AR POR 15 MINUTOS. O VALOR MÁXIMO DE A_R ESTÁ EM 532 NM. CONCENTRAÇÃO DE NITRITO = $2,17 \times 10^{-3} \text{ MOL L}^{-1}$ 57
- FIGURA 5.** SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OTIMIZADA COM SUA RESPECTIVA CURVA DE NÍVEL PARA A MEDIDA DE REFLECTÂNCIA EM 532 NM EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS: CONCENTRAÇÃO DE NAFTILETILENODIAMINA (MOL L^{-1}) E CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO SULFANÍLICO (MOL L^{-1})..... 64
- FIGURA 6.** GRÁFICO MOSTRA A ESTABILIDADE ÓPTICA DO PRODUTO COLORIDO A PARTIR DE 10 MINUTOS ATÉ 60 MINUTOS DEPOIS DE FEITO O *SPOT TEST*. 66

FIGURA 7. CURVA ANALÍTICA. CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE NITRITO:

$2,90 \times 10^{-4}$ A $1,74 \times 10^{-3}$ MOL L⁻¹. CADA PONTO FOI ANALISADO EM TRIPLICATA.

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR: (R) = 0,997. EQUAÇÃO DA RETA:

$$A_R = - 0,53651 + 0,46156 \times C. \dots\dots\dots 69$$

FIGURA 8. CURVA ANALÍTICA. FAIXA DE CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES DE PADRÃO

DE NITRITO: $7,17 \times 10^{-6}$ A $4,35 \times 10^{-4}$ MOL L⁻¹. CADA PONTO FOI ANALISADO EM

TRIPPLICATA. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR (R) = 0,997. EQUAÇÃO DA

$$\text{RETA: } A_R = 0,02236 + 541.46901 \times C. \dots\dots\dots 71$$

Lista de Tabelas

TABELA 1. TEORES MÍNIMO E MÁXIMO DE NITRITO ENCONTRADOS EM ALGUNS ALIMENTOS.....	23
TABELA 2. ALGUMAS METODOLOGIAS DESCRITAS NA LITERATURA PARA A DETECÇÃO DE NITRITO, POR MEIO DA REAÇÃO DA GRIESS.....	29
TABELA 3. OUTROS REAGENTES CROMOGÊNICOS PROPOSTOS NA LITERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE NITRITO.	30
TABELA 4. ALÍQUOTAS TOMADAS DAS SOLUÇÕES ESTOQUES DE NAFTILETILENODIAMINA E ÁCIDO SULFANÍLICO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO UTILIZADAS NO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL E AS CONCENTRAÇÕES FINAIS DE CADA SOLUÇÃO DE TRABALHO.....	48
TABELA 5. VALORES DE A_R OBTIDOS PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO CLORÍDRICO NAS SOLUÇÕES REAGENTES, TESTADAS COM TRÊS VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE NITRITO, CADA UMA.....	59
TABELA 6. FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL, EM SEUS RESPECTIVOS NÍVEIS.....	62
TABELA 7. MATRIZ EXPERIMENTAL DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL, JUNTAMENTE COM OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS. SOLUÇÃO PADRÃO DE NITRITO $2,17 \times 10^{-3} \text{ MOL L}^{-1}$	63

TABELA 8. VALORES MÉDIOS DE REFLECTÂNCIA, SEUS RESPECTIVOS DESVIOS-PADRÃO E DESVIOS-PADRÃO RELATIVOS PARA OS <i>SPOT TESTS</i> MEDIDOS EM INTERVALOS REGULARES DE 24 HORAS.....	67
--	----

TABELA 9. RESULTADOS DA RECUPERAÇÃO DE NITRITO ADICIONADO A AMOSTRAS DE ÁGUAS SUPERFICIAIS.	72
---	----

TABELA 10. DETERMINAÇÃO DE NITRITO EM AMOSTRA DE SALSICHA.....	74
---	----

TABELA 11. RESULTADOS DE RECUPERAÇÃO DE NITRITO ADICIONADO ÀS AMOSTRAS DE SALSICHAS.	75
--	----

Lista de abreviaturas e siglas

FIA	análise por injeção em fluxo (do inglês, <i>flow injection analysis</i>)
LDR	<i>light dependent resistor</i> (resistor dependente de luz)
LED	<i>light emitting diode</i> (diodo emissor de luz)
NED	dicloridrato de naftiletienodiamina
OxiHb	oxiemoglobina (hemoglobina)
MetHb	metaemoglobina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

Lista de Símbolos

A absorvância

A_R intensidade óptica para medida de reflectância

b caminho óptico

C concentração

I intensidade da radiação refletida

I_0 intensidade da radiação incidente

r coeficiente de correlação linear

R reflectância ou poder de reflexão

s coeficiente de dispersão

ε absorvidade molar

k coeficiente de absorção molar

h constante de *Planck* ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s)

ν frequência

$\lambda_{\text{máx}}$ comprimento de onda no qual a absorvância de um composto é máxima

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO	17
I.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O NITRITO.....	18
I.1.2. METAEMOGLOBINEMIA	19
I.1.3. O NITRITO COMO ADITIVO ALIMENTAR	22
 CAPÍTULO II. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO	 25
 CAPÍTULO III. OBJETIVOS	 33
 CAPÍTULO IV. ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA COMBINADA COM SPOT TEST	 35
IV.1. SPOT TEST	36
IV.2. ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA – CONSIDERAÇÕES GERAIS... 37	
IV.2.1. ASPECTOS TEÓRICOS DA ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA ... 38	
IV.2.3. INSTRUMENTAÇÃO	40
IV.2.4. APLICAÇÕES DA ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA	42
 CAPÍTULO V. PARTE EXPERIMENTAL	 45
<i>V.1. Materiais e equipamentos</i>	46
<i>V.1.1 Reagentes</i>	46
<i>V.1.2 Preparo das soluções</i>	47
V.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	49
V.2.1 <i>Spot test</i>	49
V.2.1.1 <i>Estudo da estabilidade óptica</i>	50
V.2.2 <i>Análise de águas doces superficiais</i>	51
V.2.3 <i>Análise de amostras de alimento</i>	51
V.2.3.4 <i>Extração do nitrito da matriz e clarificação do extrato</i>	52
 CAPÍTULO VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 53
<i>VI.1 Spot test</i>	54
<i>VI.2 Planejamento de experimentos</i>	61
<i>VI.3 Estabilidade óptica</i>	65
<i>VI.4 Curva analítica</i>	68
<i>VI.5 Análise de águas superficiais</i>	72
<i>VI.6 Análise de amostras de alimento</i>	73
 CAPÍTULO VII: CONCLUSÕES	 77
 CAPÍTULO VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS	 80
 CAPÍTULO IX. REFERÊNCIAS	 82

Capítulo I. Introdução

I.1. Considerações Gerais Sobre o Nitrito

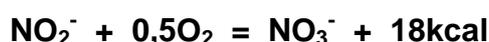
A exploração lucrativa do nitrito ao longo dos séculos contribuiu muito para o desenvolvimento da sociedade moderna. O íon nitrito tornou-se com o passar dos tempos, uma substância bastante importante e ubíqua, sendo encontrada em amostras de alimentos, sistemas industriais, fluidos biológicos e no meio ambiente¹. Entretanto, o uso incessante que se faz desse agente versátil, combinado com as revelações sobre a sua potencial toxicidade, têm levantado inúmeras questões quanto a periculosidade que oferece para a saúde humana.

O nitrito (NO_2^-) é a base conjugada do ácido nitroso (HNO_2), um ácido fraco com $\text{pK}_a = 3,37$. Os sais de nitrito são altamente solúveis em água, com exceção do nitrito de prata².

No meio ambiente, o nitrito é formado por um processo de oxidação do íon amônio, mediado por bactérias do gênero *Nitrosomonas* no solo. Este processo, conhecido como nitrificação, ocorre em duas etapas distintas. Na primeira etapa, chamada nitrificação, o íon amônio é oxidado a nitrito, através da seguinte reação:



Na segunda etapa, denominada nitratação, bactérias do gênero *Nitrobacter*, transformam o íon nitrito em nitrato, através da seguinte reação:



O processo de nitrificação faz parte do ciclo do nitrogênio na natureza e fornece a energia necessária ao crescimento dos microrganismos do solo⁴.

O nitrito é encontrado no meio ambiente somente em nível de traços, estando sempre acompanhado de nitrato. Em águas naturais^{5,6}, a concentração de ânions nitrito é raramente superior a 0,1 mg mL⁻¹. Entretanto, ele é adicionado à água usada em processos industriais, como agente inibidor da corrosão, podendo, assim, estar presente em esgotos. Por outro lado, sendo o nitrito um produto da redução do nitrato, estará freqüentemente presente em sistemas nos quais o íon nitrato atue como agente oxidante. Neste sentido, o aumento da concentração do nitrato carregado pela lixiviação do solo de propriedades agrícolas para cursos d'águas vem causando preocupação do ponto de vista ecológico. Neste caso, as principais fontes artificiais de nitrato são dejetos animais e nitrato de amônio, de sódio e de potássio não absorvido dos fertilizantes⁵. Por ser um produto final da oxidação bioquímica do nitrogênio ligado à matéria orgânica, a alta concentração de nitrato em águas naturais pode também servir como evidência de poluição oriunda do despejo de esgotos domésticos e industriais⁷. Além disso, a alta hidrossolubilidade e mobilidade deste íon no solo permitem que a sua concentração aumente consideravelmente em águas subterrâneas e poços⁸.

I.1.2. Metaemoglobinemia

O íon nitrato é relativamente não-tóxico, porém quando reduzido a nitrito, por ação das bactérias anaeróbias *Staphylococcus scieuri* e *S. intermedius* presentes na língua, sua toxicidade aumenta, podendo ser fatal a lactentes e a indivíduos com particular deficiência enzimática^{5, 9, 10}.

Esta flora especial é induzida por uma dieta rica em nitrato e, dependendo da quantidade ingerida deste íon, uma alta concentração de nitrito pode ser produzida na boca⁹. Depois de engolida a saliva, o nitrito atinge o estômago e é, então, absorvido pela corrente sanguínea. Uma vez presente, ele oxida o íon ferroso (Fe^{2+}) da oxiemoglobina (OxiHb) ao estado férrico (Fe^{3+}), transformando-a assim em metaemoglobina (MetHb)^{7,9,11}. A metaemoglobina é incapaz de transportar oxigênio, o que pode levar o indivíduo à morte por asfixia, dependendo da sua concentração no sangue¹⁰. Quando os níveis de exposição a nitrito são baixos, a formação da MetHb é reversível, pois a enzima NADH-metaemoglobina-redutase converte-a novamente a oxiemoglobina e nitrato^{9,10}. Porém, quando o nível de exposição é elevado, este sistema é saturado, resultando em um aumento da concentração de MetHb no sangue. Concentrações em níveis superiores a 50% podem ser fatais. Essas concentrações no sangue são atingidas, em um adulto, quando se ingere cerca de 15 a 30 g de sal de nitrato ou nitrito³.

A Figura 1 apresenta a reação de formação da metaemoglobina pelo nitrito e a reação de conversão para oxiemoglobina (hemoglobina).

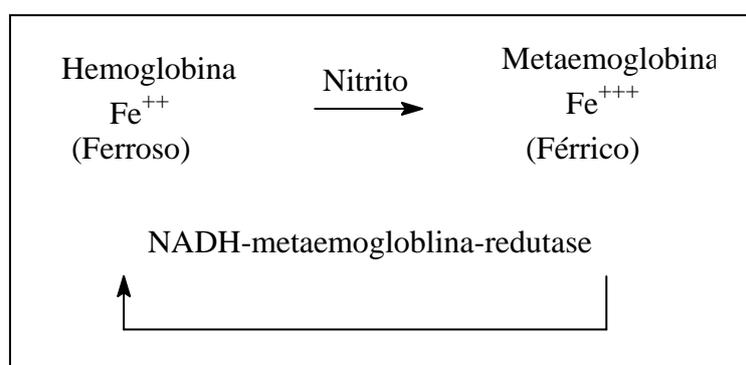


Figura 1. Formação de metaemoglobina pelo nitrito e sua conversão à hemoglobina¹¹.

Em 1945, a morte de vários recém-nascidos por metaemoglobinemia (síndrome causada pelo excesso de metaemoglobina no sangue) em uma área rural dos Estados Unidos foi relacionada com a ingestão de formulação alimentícia infantil, preparada com águas de poços contaminadas com nitrato e bactérias redutoras de nitrato. Desde então, diversas pesquisas foram direcionadas ao estudo da metaemoglobinemia, sua prevenção e tratamento. Entretanto, sinais clínicos desta doença devido ao consumo de água contaminada nunca foram registrados em adultos. Por isso, a metaemoglobinemia ficou conhecida pelo nome de “Síndrome do Bebê Azul”⁹.

Segundo MCKNIGHT⁹, BRUNNING-FANN e KANEENE¹⁰, alguns fatores explicam porque a metaemoglobinemia é fatal apenas para lactentes: o primeiro refere-se à pouca acidez gástrica. Crianças desta idade possuem pH gástrico mais elevado ($\text{pH} > 4$)⁹ o que as torna mais suscetíveis à ação das bactérias redutoras de nitrato. A acidez estomacal aumenta à medida que a criança envelhece, e só atinge um nível capaz de amenizar a ação de tais bactérias após a criança atingir os três meses de idade¹⁰. Além disso, nesta idade, o estômago imaturo secreta baixas concentrações de agentes redutores, tais como o ácido ascórbico, que minimizariam a concentração do nitrito absorvido. Um terceiro fator está relacionado com a pequena quantidade de metaemoglobina-redutase que os recém-nascidos possuem no sangue, cerca de 60% menor do que os adultos, pois este sistema enzimático amadurece no indivíduo somente após o período de amamentação¹¹. Acredita-se que o último fator esteja associado com a grande quantidade de água que as crianças consomem em relação ao próprio peso corporal (cerca de três vezes mais do que um adulto)^{9,10}.

É importante ressaltar que alguns indivíduos podem possuir uma deficiência congênita da enzima deidrogenase-glicose-6-fosfato, o que leva a uma deficiência secundária de NADH-metaemoglobina-redutase, mesmo na fase adulta^{5,9-11}.

O tratamento de pacientes com metaemoglobinemia pode ser realizado pela administração oral ou intra-venosa de ácido ascórbico¹⁰ e a prevenção pode ser realizada pela ingestão regular de vitamina C ou retirando-se da dieta alimentos ricos em nitrato, como espinafre e rabanete¹³, rúcula¹⁴, queijos¹⁵ e salsichas¹⁶.

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente, na Resolução nº 357 de 17 de março de 2005, estabelece a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de nitrito, como limite máximo permitido deste íon em águas doces naturais¹⁷. Para o teor de nitrato e nitrito em água potável, a Resolução nº 310, de 16 de junho de 1999 (Ministério da Saúde), estabelece os limites de 50 mg L⁻¹ calculados como nitrato e 0,02 mg L⁻¹, calculado como nitrito¹⁸.

I.1.3. O nitrito como aditivo alimentar

O nitrito é um excelente antioxidante e conservante de produtos cárneos. A sua eficácia contra a espécie *Clostridium botulinum* (causadora do botulismo) e no controle de outros microrganismos, como a *Listeria monocytogenes*, o torna um dos aditivos alimentares mais utilizados para tais produtos.

Estando presente também em formulações para cura de carnes e derivados, o nitrito é o ingrediente responsável pelo sabor e odor característicos dos alimentos curados, bem como pela manutenção da coloração avermelhada que eles possuem¹⁹. Neste caso, o íon está inserido

num ciclo dinâmico, que ocorre na presença de oxigênio, envolvendo três pigmentos, chamados oximioglobina, mioglobina e metmioglobina. A captura de oxigênio pela mioglobina converte este pigmento roxo à oximioglobina, de coloração vermelha. Quando a carne (ou um derivado cárneo) passa pelo processo de cura, o nitrito funciona como um forte agente oxidante, favorecendo a reação de formação da oximioglobina²⁰, o que melhora o aspecto do produto em questão, tornando-o mais atraente para o consumo. A Tabela 1 mostra os teores de nitrito encontrados por alguns pesquisadores em alguns produtos cárneos.

Tabela 1. Teores mínimo e máximo de nitrito encontrados em alguns alimentos.

Tipo de alimento	Nitrito (mg kg⁻¹)	Referência
Lingüiça de porco	81,6 – 83,9	OLIVEIRA, LOPES e RANGEL ²¹
Mortadela	12,4 – 12,6	OLIVEIRA, LOPES e RANGEL ²²
Salsicha	0,03 – 4,35	ENSAFI e KAZEMZADEH ²² ; ENSAFI e DEHAGHEI ²²
Presunto	0,40 – 0,46	HE et al ²⁴
Carne	38 - 76	VELASCO-ARJONA et al ²⁵

Entretanto, existem evidências de que a ingestão de grandes quantidades de nitrito possa estar associada ao câncer de estômago e de intestino²⁶, à leucemia e ao surgimento de tumores cerebrais em crianças²⁷. O nitrito pode reagir com aminas secundárias e terciárias presentes no meio estomacal ou mesmo nos alimentos, para formar as nitrosaminas, que são conhecidas como compostos altamente carcinogênicos^{10,28}. Além disso, através da sua reação com certos aminoácidos presentes no organismo, o nitrito é capaz de produzir compostos mutagênicos²⁹.

No Brasil, a Secretaria de Vigilância Sanitária, estabelece o valor de 0,015g de nitrito residual (calculado como nitrito de sódio) permitido em 100g de produto cárneo³⁰. O nitrito é considerado prejudicial à saúde, quando presente acima desta concentração nos alimentos.

Capítulo II. Métodos Analíticos para quantificação de Nitrito

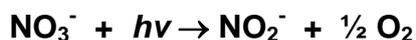
A necessidade de monitorar a quantidade de nitrito presente em amostras ambientais, em alimentos ou até mesmo em fluidos biológicos é inquestionável, uma vez que o uso incessante deste íon pode provocar malefícios à saúde humana e ao meio ambiente¹. Diante deste fato, um grande número de metodologias para a determinação de nitrito em diversas matrizes têm sido propostas na literatura.

A maioria dos métodos desenvolvidos envolve a detecção espectrofotométrica^{16,21,22,31-50} ou eletroquímica⁵¹⁻⁶⁰, sendo que muitos destes procedimentos são executados por sistemas automatizados^{16,21,22,31-35,37,43-48,50}. Outras metodologias envolvem ainda a quimioluminescência^{24,61-64}, absorção atômica⁶⁵, a fluorimetria⁶⁶⁻⁶⁷ e a cromatografia⁶⁸.

Um grande número das metodologias propostas para a determinação de nitrito objetiva, na verdade, a determinação indireta do óxido nítrico presente em materiais biológicos³⁹⁻⁴¹. Esta pequena molécula sofre autooxidação, produzindo nitrato e nitrito e é através da quantificação destes íons que a sua ação no organismo pode ser detectada⁶⁹⁻⁷².

Algumas estratégias para detecção de nitrato, também são feitas indiretamente, através da detecção de nitrito. Geralmente, o íon nitrato, relativamente inerte, é quimicamente reduzido a nitrito, previamente às análises. Os redutores mais comumente utilizados são colunas de cádmio recobertas por sulfato de cobre^{21,22,31-34}. Entretanto, outros materiais já foram descritos. ABBAS e MOSTAFA⁷³ utilizaram uma coluna de cádmio amalgamado com mercúrio para reduzir o nitrato presente em amostras de água potável. CALATAYUD, MATEO e DAVID³⁷, desenvolveram um sistema automatizado, no qual o nitrato presente nas amostras é convertido a nitrito por

meio de uma fotorredução através da absorção de luz UV. Para tanto, eles utilizaram uma lâmpada de mercúrio como fonte de radiação, e o processo ocorreu de acordo com a reação estequiométrica mostrada abaixo:



Posteriormente, solução de cloreto de vanádio foi utilizada por MIRANDA, ESPEY e WINK³⁸, em 2001, para reduzir nitrato a nitrito, em temperatura ambiente. Outra forma de proceder a redução do nitrato envolve o uso da enzima NADPH-nitrato redutase⁴¹.

Em metodologias envolvendo técnicas cromatográficas e eletroforese capilar, a redução prévia do nitrato não é necessária, visto que este possui um tempo de eluição diferente do nitrito^{71,74,75}.

Os métodos espectrofotométricos na região visível do espectro são os mais frequentemente empregados para análise de nitrito, devido aos baixos limites de detecção, rapidez, simplicidade e versatilidade de reagentes cromogênicos⁷⁶. A reação mais comumente empregada é, sem dúvida, a clássica reação de Griess¹, utilizando a naftiletilenodiamina e o ácido sulfanílico ou a sulfanilamida, como reagentes cromogênicos, em meio de ácido acético, fosfórico ou clorídrico. O valor de absorbância máxima do produto colorido proveniente da reação de Griess está sempre na faixa entre 500 e 600 nm, dependendo do reagente utilizado^{31,36,47-49}.

Na Tabela 2 são citados alguns métodos espectrofotométricos que utilizam a reação de Griess para a determinação de nitrito, seus limites de detecção e as faixas de linearidade observadas.

A busca por maior sensibilidade dos métodos desenvolvidos para a determinação de nitrito em matrizes diferentes levou à proposição de outras reações para a quantificação deste íon. Dentro deste conjunto de novas reações, destaca-se a proposta por KADOWAKI, NAKANO e KAWASHIMA⁴⁵, em 1999. Este método baseia-se no efeito catalítico que o nitrito exerce sobre a reação de acoplamento da *N*-fenil-*p*-fenilenodiamina com a *N,N*-dimetilanilina, formando um composto de coloração verde ($\lambda_{\text{máx}} = 735 \text{ nm}$). O limite de detecção obtido foi de $0,6 \text{ ng mL}^{-1}$ e a linearidade foi observada entre $2,0$ e 100 ng mL^{-1} de nitrito. Outro método que se destaca pelo baixo limite de detecção é o proposto por KUZNETSOV, ZEMYATOVA e ERMOLENKO⁴⁶, em 2005. Este método também apresentou baixíssimo limite de detecção: $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$.

Outras reagentes cromogênicos, propostos na literatura para análise de nitrito em diversas matrizes, são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 2. Algumas metodologias descritas na literatura para a detecção de nitrito, por meio da reação da Griess.

Autores	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Limite de detecção	Linearidade
LAPA, LIMA e PINTO ⁴⁹	543	0,01 mg L ⁻¹	0,05 – 25 mg L ⁻¹
GALHARDO e MASINI ³²	540	6,0 x 10 ⁻³ mg L ⁻¹	0,01 – 1,0 mg L ⁻¹
*GIUSTARINI et al ⁴⁰	540	2,3 x 10 ⁻³ mg L ⁻¹	0 – 6,44 x 10 ⁻² mg L ⁻¹
GAL, FRENZEL e MÖLLER ⁵⁰	540	3 x 10 ⁻³ mg L ⁻¹	0,01 – 1,0 mg L ⁻¹
HIRATA, KARTHIKEYAN e KAJIYA ³⁶	525	7 x 10 ⁻³ mg L ⁻¹	0,007 – 5,0 mg L ⁻¹
BAEZA, BARTOLÍ e ALONSO ⁴⁷	555	0,048 mg L ⁻¹ ou 0,4 mg L ⁻¹	0,0 – 3,0 mg L ⁻¹ ou 0,0 – 20 mg L ⁻¹
BAEZA et al ⁴⁸	540	0,17 mg L ⁻¹	0 – 50 mg L ⁻¹
MELCHERT, INFANTE e ROCHA ⁴⁴	540	8 x 10 ⁻³ mg L ⁻¹	0,1 -1,0 mg L ⁻¹

* Método não-automatizado para análise de nitrito em amostras de fluidos biológicos.

Tabela 3. Outros reagentes cromogênicos propostos na literatura para determinação de nitrito.

Reagentes	Limite de detecção	Linearidade	Autores
Tiouréia e Fe(III)	0,17 mg L ⁻¹	0 – 10 mg L ⁻¹	POURHOSSEIN, AMINI e TALEBI ⁷⁷
1,3,5-trihidróxibenzeno em meio ácido	0,29 x 10 ⁻³ mg mL ⁻¹	0 – 3,22 mg L ⁻¹	BURAKHAM et al ³⁵
Safranina	20 ng mL ⁻¹	30 – 4000 ng mL ⁻¹	MOUSAVI, JABBARI e NOUROOZI ¹⁶

A automatização se mostra como uma tendência atual observada nas diversas publicações sobre novas metodologias para determinação de nitrito¹, com diferentes formas de detecção, tais como a espectrofotométrica⁴⁴, a eletroquímica³³ ou por quimioluminescência²⁴. As análises realizadas por sistemas de injeção em fluxo (FIA) são opções que resultam em economia de

reagentes, alta frequência analítica e boa repetibilidade das medidas³⁴, permitindo também o tratamento *on-line* dos resíduos gerados durante as determinações⁴⁴. Como exemplo deste fato, pode ser citado o trabalho de MELCHERT, INFANTE e ROCHA⁴⁴, que mostra o desenvolvimento de um método espectrofotométrico, utilizando a técnica de FIA para quantificar o nitrito presente em amostras de águas naturais. O método apresentou boa sensibilidade, com limite de detecção igual a $8 \mu\text{g L}^{-1}$, linearidade na faixa de concentrações entre 100 e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de nitrito e uma frequência analítica de 108 determinações por hora. Os resíduos gerados durante o processo reacional foram tratados antes de atingirem o recipiente para descarte. Com a reação de foto-Fenton, cerca de 87% do resíduo foi mineralizado por fotodegradação. Porém, a maior parte dos trabalhos publicados não apresenta uma etapa de tratamento de resíduos, previamente ao descarte, mesmo sendo possível. Este fato insere uma desvantagem no conjunto dos métodos para análise de nitrito por FIA, tornando-os poluentes, uma vez que a não-geração de resíduos em FIA, até o presente momento, mostrou-se impossível.

Além, disso, mesmo com todas as vantagens que a automatização pode oferecer, para alguns tipos de amostras, os métodos que utilizam FIA não são viáveis. Geralmente, volumes muito pequenos (apenas alguns mililitros, no total) são disponibilizados para análise, quando se trata de amostras de sangue, plasma e sobrenadantes de culturas celulares. Portanto, o desenvolvimento de novos métodos sensíveis, não automatizados, que não necessitem de grandes quantidades de amostra para a quantificação do analito, mostra-se necessário.

Outro fator importante que deve ser levado em conta quando se desenvolve um novo método analítico é a responsabilidade ambiental. O desenvolvimento de metodologias mais limpas, que gerem menos resíduos tóxicos ao meio ambiente, tem sido o foco de atenção de diversos analistas. Como consequência, métodos muito eficientes, mas que necessitam de grandes volumes de reagentes, gerando grandes quantidades de resíduos, surgem como opções descartáveis de procedimento.

Metodologias baseadas na combinação spot test com detecção por reflectância difusa são extremamente simples e econômicas, gerando mínima quantidade de resíduos⁷⁸. Os volumes de amostra e de reagentes necessários para a realização das análises são relativamente pequenos, quando comparado a outros métodos analíticos. Por ser menos poluente, esta metodologia é considerada “limpa” ou “ambientalmente amigável”, e está de acordo com os princípios defendidos pela Química Verde⁷⁹.

Capítulo III. Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- I. O desenvolvimento de metodologia analítica simples, rápida, sensível e que atenda aos princípios da Química Verde para a análise de nitrito utilizando a espectroscopia de reflectância difusa combinada com *spot test*;
- II. Otimização dos parâmetros experimentais através de ferramentas quimiométricas (planejamento composto central e metodologia de superfície de resposta);
- III. Aplicação da metodologia desenvolvida à análise de amostras ambientais e de alimentos.

**Capítulo IV. Espectroscopia de
Reflectância Difusa combinada com
*Spot Test***

IV.1. Spot Test

Nas últimas quatro décadas, as reações clássicas de *spot tests* têm sido largamente aplicadas em análises clínicas, testes para o controle da qualidade do ar, análises de água e alimentos, prospecção geoquímica e ainda em outras áreas da química analítica⁸⁰. Pela simplicidade extrema, rapidez e a economia de tempo e reagentes que possibilitam, os *spot tests* surgem como uma alternativa para o desenvolvimento de métodos analíticos mais limpos⁸¹⁻⁸³. A confecção de um *spot test* é muito simples, consistindo apenas da mistura de algumas gotas da solução de analito ou solução-teste com algumas gotas da solução de reagente, formando-se assim, um produto colorido. O meio para a reação pode ser uma superfície porosa, como papel de filtro⁸⁴, pastilhas de sílica gel, ou mesmo uma superfície lisa, como uma placa de porcelana⁸⁰.

Em meados do século XIX, alguns testes químicos já eram realizados sobre a superfície de papéis de filtro. Runge, considerado o criador da técnica do *spot test*, desenvolveu, em 1822, um teste para detecção de cloreto em soluções alvejantes. Quando gotas da solução de alvejante eram adicionadas ao papel impregnado com amido e iodeto de potássio, um círculo azul era formado em consequência da liberação do iodeto e da reação entre o cloreto e o amido⁸³. Vinte e cinco anos mais tarde, Hugo Schiff desenvolveu um método para detecção de ácido úrico, impregnando papel de filtro com carbonato de prata^{80,84}. Posteriormente, Fritz Feigl se destacou como o cientista que estudou e desenvolveu diversas reações orgânicas e inorgânicas mais seletivas e sensíveis por *spot tests*⁸⁴.

Os *spot tests* constituem uma técnica colorimétrica, que pode ser usada para análises qualitativas, quando a detecção da substância de interesse se dá

visualmente pela presença de cor; para análises semi-quantitativas – na quais escalas de cores, feitas com padrões analíticos de diferentes concentrações, são utilizadas para comparação com a intensidade de cor do teste e para análises quantitativas, nas quais utilizam-se, por exemplo, instrumentos para medir a luz refletida, neste caso, a espectroscopia de reflectância difusa. Em análises semi-quantitativas ou quantitativas, o procedimento para a realização do *spot test* deve ser bem elaborado, de modo que haja uniformidade na cor da mancha formada e, conseqüentemente, uma boa precisão das medidas. Detalhes importantes da execução do *spot test* envolvem o controle do volume da solução a ser adicionada utilizando micropipetas ou microseringas e da velocidade da adição das soluções, bem como a escolha da ordem de adição que resulte em maior uniformidade da mancha colorida formada.

Métodos para análises quantitativas envolvendo *spot tests* com detecção por espectroscopia de reflectância difusa são interessantes do ponto de vista da Química Verde, que preconiza o desenvolvimento de novos métodos mais ambientalmente amigáveis⁷⁹. Os *spot tests* são simples, rápidos, econômicos e geram mínima quantidade de resíduos, sendo, portanto, métodos menos poluentes. Além dessas vantagens, estes métodos possuem também a característica da portabilidade, quando se faz uso de detectores operados à bateria, que podem ser levados para a realização de análises *in situ*^{83, 86}.

IV.2. Espectroscopia de Reflectância Difusa – Considerações Gerais

A percepção óptica das espécies químicas é baseada na sua interação com a luz. Absorção, emissão e reflexão são as três técnicas ópticas comumente empregadas em medidas quantitativas⁸⁷. Contrastando com as

medidas de transmitância, amplamente utilizadas em análises quantitativas, a espectroscopia de reflectância difusa tem sido pouco estudada em química analítica. Durante muito tempo, a sua utilização foi limitada às áreas de pigmentos, tintas, têxtil, papel, cerâmica e metalurgia para avaliar algumas propriedades destes materiais, tais como coloração e brilho⁸⁸. Porém, pouca atenção foi dada à reflectância difusa como uma técnica para análises quantitativas, porque os valores de precisão obtidos por medidas de reflectância difusa de *spot tests* convencionais eram muito baixos (entre 10 e 20%)⁸⁹. Entretanto, com o recente desenvolvimento de novos dispositivos, como fibras ópticas, esferas de reflectância e reflectômetros construídos em laboratório, resultados aceitáveis passaram a ser obtidos^{87,90,91}. Hoje, é possível desenvolver métodos reflectométricos quantitativos em suportes sólidos ou trabalhar em solução, medindo-se a reflectância difusa de sólidos suspensos, com bons resultados⁹³.

IV.2.1. Aspectos Teóricos da Espectroscopia de Reflectância Difusa

A espectroscopia de reflectância difusa baseia-se na medida da radiação refletida por uma superfície irregular. Ao contrário da reflexão especular (ou regular) que ocorre em superfícies lisas, a reflexão difusa ocorre em superfícies irregulares foscas ou opacas⁸⁸.

A reflexão advinda de uma superfície irregular é geralmente composta por uma componente especular, cujo ângulo de reflexão é igual ao ângulo de incidência da radiação, sendo descrita pela lei de Fresnel, e uma componente difusa.

A reflexão difusa acontece após a penetração da radiação incidente no interior do sólido; uma parte desta radiação retorna à superfície da amostra depois de ter sofrido absorção e reflexões múltiplas nas superfícies de cada uma das partículas que a compõem. Desta maneira, a radiação é dispersa em uma faixa de vários ângulos⁸⁸.

Em medidas por espectroscopia de reflectância difusa, um reflectômetro registra o sinal da radiação difusamente refletida, também chamada de poder de reflexão (R). A intensidade óptica em medidas de reflectância é dada por $A_R = -\log R$, similarmente à transmitância e o poder de reflexão é definido por:

$$R = \frac{I}{I_0} \quad \text{onde,} \quad (\text{Equação 1})$$

I_0 é a intensidade da energia radiante incidente e I é a intensidade da energia que é refletida para o meio. Portanto, o valor de R está sempre entre os limites $0 < R < 1$.

O valor de R será igual a 1 toda vez que o poder de reflexão absoluto puder ser medido a partir de um padrão de máxima reflectância, geralmente pastilhas de BaSO_4 ou MgO . Entretanto, para medidas relativas, como nos casos de determinações analíticas baseadas em curvas de calibração, o poder de reflexão pode ser considerado igual a 1 para o material refletor considerado como o branco⁹⁴.

Várias relações foram propostas para a determinação de um analito através de medidas de reflectância. A relação entre R e concentração da amostra, C, é dada pela equação de Kubelka-Munk⁸⁷⁻⁸⁹, descrita a seguir:

$$f(R) = \frac{(1 - R')^2}{2 \cdot R} = \frac{k}{s}, \quad \text{onde:} \quad (\text{Equação 2})$$

k = coeficiente de absorção molar

s = coeficiente de dispersão

Para amostras diluídas, k está relacionado à absorvidade molar (ϵ) e à concentração (C) pela relação: $k = 2,303\epsilon.C$.

Para a aplicação correta dessa equação é necessário determinar a reflectância absoluta do material de referência⁸⁸.

Atualmente, diversos gráficos têm sido descritos para análises quantitativas envolvendo transformações matemáticas da variável dependente (sinal) e/ou independente (concentração), tais como: $\log R$ versus $C^2 - R$; R versus $[C/(1-C)^2]$; $\log R$ versus $1/C$; e R versus $\log C$ ^{87, 90,91}.

IV.2.3. Instrumentação

Medidas de reflectância difusa podem ser obtidas através da utilização de equipamentos portáteis ou de acessórios de reflectância acoplados a um espectrofotômetro. Em geral, os reflectômetros contêm os seguintes componentes: fonte de luz, suporte para amostra e para padrão branco usado como referência, esfera de integração, espelhos, detector e registrador. A Figura 2 apresenta um esquema de um acessório de reflectância Labsphere, modelo RSA-HP-53.

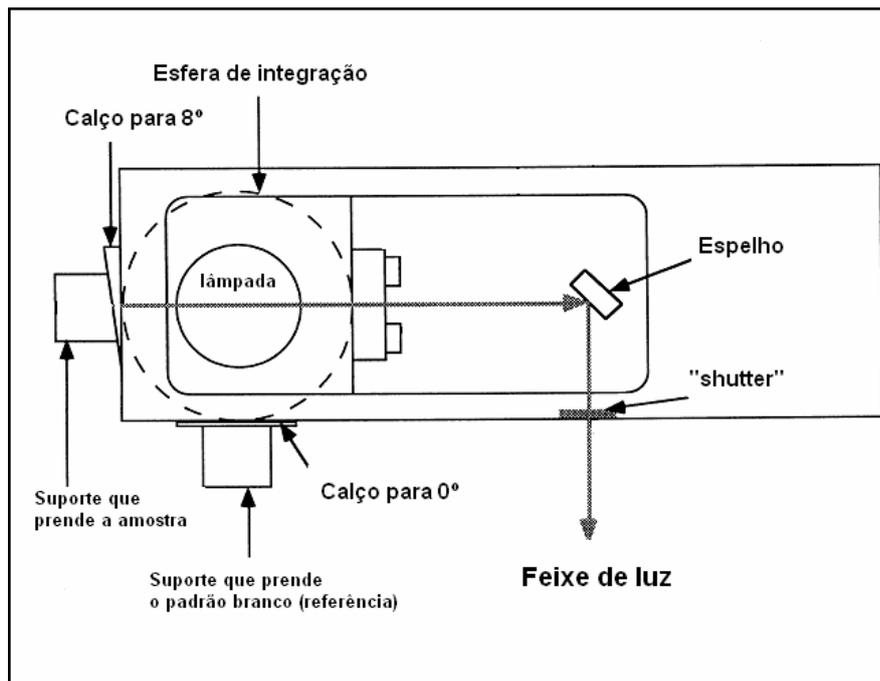


Figura 2. Vista superior do acessório de reflectância Labsphere modelo RSA-HP-53. Fonte: LABSPHERE. *RSA-HP-53 instruction manual*. North Sutton, [1999]. p. 4.

Como descrito por WENDLANDT e HECHT (1966) “a esfera de reflectância é um sólido oco, cujas paredes são constituídas por um material que reflete a radiação, de qualquer comprimento de onda de interesse, difusamente e com alto poder de reflexão”.⁸⁸ Antigamente, as esferas de integração eram fabricadas com material metálico revestido com tinta branca ou pó de MgO ou de BaSO₄ prensado. Atualmente, são utilizados materiais brancos de politetrafluoroetileno (PTFE) ou outros termoplásticos, como o Spectralon e o Spectrafect®⁹⁵.

A esfera de integração tem a função de coletar e integrar espacialmente o fluxo de radiação refletida por uma superfície. Assim, a intensidade da

radiação refletida em qualquer parte da esfera é uma medida do fluxo total da radiação refletida pela mesma, independentemente da distribuição espacial e da posição da fonte de radiação^{88,95}.

IV.2.4. Aplicações da Espectroscopia de Reflectância Difusa

Diversos métodos por espectroscopia de reflectância difusa, na região do visível, para análises quantitativas são descritos na literatura^{78,80,82,83,86,87,90,91,93,96-99}.

TUBINO, ROSSI e MAGALHÃES⁹⁰ desenvolveram métodos para a determinação de Fe(III), Cr(IV) e Ni(II), utilizando papel de filtro como suporte sólido para a reação. GHAUCH *et al*⁸⁷ desenvolveram métodos para determinação de amônio, hidrogenofosfato e cobre (II). Um ano mais tarde, métodos semelhantes aos descritos por TUBINO, ROSSI e MAGALHÃES⁹⁰ foram desenvolvidos para a determinação de Cu(II), Co(II), Ni(II) e Fe(III), em água⁹¹, todos utilizando papel de filtro.

Outros pesquisadores utilizaram como suporte sólido para as reações, membranas de extração em fase sólida (EFS)^{86,96-99}. ZAPOROZHETS e TSYUKALO⁹⁶ desenvolveram um método para determinação de Pb(II) através da imobilização do complexo formado entre o Fe(III) e o alaranjado de xilenol sobre uma superfície de sílica. Outro método para determinação de Ni(II) por espectroscopia de reflectância difusa foi desenvolvido por GAZDA, FRITZ e PORTER⁸⁶. O precipitado, produzido a partir da reação entre níquel e dimetilglioxima, foi coletado nas membranas de EFS e as medidas de reflectância difusa foram tomadas por um reflectômetro portátil. Este método foi desenvolvido com sucesso para ser utilizado em análises da água de estações

espaciais. Em 2006, ZANJANCHI, NOEI e MOGHIMI⁹⁹ desenvolveram um método para a determinação de alumínio, utilizando membranas de sílica C18 para imobilização do complexo de alumínio formado. Métodos para análise de compostos não-metálicos também foram descritos^{97,98}. ARENA, PORTER e FRITZ⁹⁷ desenvolveram um método para determinação de iodo e iodeto e MOLINER-MARTINEZ, HERRAEZ-HERNANDEZ e CAMPINAS-FALCO⁹⁸ melhoraram o limite de detecção do método para quantificação de amônio pela reação de Berthelot, utilizando membranas de EFS como suporte sólido para medidas de reflectância.

A espectroscopia de reflectância difusa permite também a construção de reflectômetros *home-made*⁹¹. Um método para determinação de diclofenaco em formulações farmacêuticas, através da sua complexação com íons Cu(II) foi desenvolvido por TUBINO e SOUZA⁹³ em 2006. O complexo colorido produzido pela reação foi submetido à análise em um reflectômetro *home-made*, composto por um LED (*light emitting diode*) e um LDR (*light dependent resistor*) e medidas de resistência foram obtidas. Posteriormente, em 2008, uma cela de fluxo composta novamente por um LED e por um LDR foi construída por TUBINO e QUEIROZ¹⁰⁰. O método para determinação de níquel através da sua reação com a dimetilglioxima foi adaptado para análise por injeção em fluxo, e sua detecção através de medidas de resistência foi realizada com sucesso.

Métodos mais recentes para a determinação de princípios ativos de medicamentos, utilizando papel de filtro como suporte sólido para a reação, são descritos na literatura^{82,83}. Tanto o método para determinação de furosemida em formulações farmacêuticas, através da sua reação com *p*-dimetilaminocinamaldeído, quanto o método para determinação de propranolol,

pela reação deste com 2,6-dicloroquinona-4-cloroimida, mostraram-se práticos e eficientes, com limites de detecção adequados para este tipo de análise e ótima precisão.

Outros trabalhos publicados recentemente mostram ainda a aplicação das medidas de reflectância na região do infravermelho próximo, para a determinação de metais em amostras de alimentos¹⁰¹ e de medicamentos em formulações farmacêuticas¹⁰².

Todos os estudos citados acima revelaram que o uso apropriado da espectroscopia de reflectância difusa forneceu resultados quantitativos confiáveis, demonstrando o potencial desta técnica para análises quantitativas.

Capítulo V. Parte Experimental

V.1. Materiais e equipamentos

As medidas de volume foram efetuadas com buretas classe A, micropipetas “Eppendorf” (10-100 μ L) e “Brand” (100-1000 μ L). A vidraria utilizada no preparo das soluções foi de grau A, as pesagens foram realizadas em balança analítica AG204, da Mettler Toledo. Para solubilização dos reagentes foi utilizado, quando necessário, um banho de ultrassom, marca Thornton.

Com a finalidade de comparar os resultados, as medidas de reflectância foram realizadas em dois equipamentos distintos. O primeiro é composto de uma esfera de reflectância da Labsphere DRA-CA 30 (150 mm) acoplada a um espectrofotômetro Carry 100 de feixe duplo, com o software WinUV, versão 3.0, Varian. O segundo é um equipamento portátil, composto de uma esfera integradora da Ocean Optics, acoplado a um espectrofotômetro USB2000 com um software OOIBase32.

V.1.1 Reagentes

Para os experimentos de espectroscopia de reflectância difusa foi utilizado papel de filtro Whatman 41 qualitativo como suporte sólido. Os reagentes utilizados para o desenvolvimento de ambos os métodos foram todos de grau P.A.:

- Dicloridrato de naftiletlenodiamina (NED) 97,0%, Sigma, Estados Unidos;
- Ácido sulfanílico (pureza não informada), Merck, Alemanha;
- Nitrito de sódio 99,0%, Merck, Alemanha;

- Ácido clorídrico, Merck, Brasil;
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 99,0%, Sigma, Estados Unidos;
- Hexacianoferrato de potássio (98,5 -102,0%), Mallinckrodt, Alemanha;
- Acetato de zinco (98,0 – 101,0%), Mallinckrodt, Estados Unidos.

V.1.2 Preparo das soluções

a) Solução estoque de nitrito: 25 mL de uma solução estoque de nitrito $2,17 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada uma vez por semana, pesando-se 37,9mg de nitrito de sódio, dissolvendo-o e completando o balão com água deionizada. Esta solução foi mantida congelada em freezer durante uma semana. O preparo das soluções de nitrito utilizadas nas diferentes etapas do desenvolvimento do método se deu por diluição da solução estoque. A pureza do NaNO_2 foi determinada por padronização, conforme descrito na literatura¹⁰³.

b) Solução de reagente cromogênico: para o planejamento composto central, 10 mL de uma solução estoque de dicloridrato de naftiletlenodiamina (NED) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pesando-se 0,267g, dissolvendo-se o composto e completando o volume com água deionizada. A seguir, 50 mL de uma solução estoque de ácido sulfanílico $7,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pesando-se 0,606g do composto, dissolvendo-o e completando o volume também com água deionizada. Alíquotas dessas duas soluções foram tomadas, misturadas em balões volumétricos de 5 mL e diluídas de modo a se obterem as concentrações finais adequadas para o planejamento, conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Alíquotas tomadas das soluções estoques de naftiletenodiamina e ácido sulfanílico para o preparo das soluções de trabalho utilizadas no planejamento composto central e as concentrações finais de cada solução de trabalho.

Solução de NED		Solução de ácido sulfanílico	
Volume da solução estoque (mL)	Concentração da solução de trabalho (mol L ⁻¹)	Volume da solução estoque (mL)	Concentração da solução de trabalho (mol L ⁻¹)
0,400	$8,00 \times 10^{-3}$	1,43	$2,00 \times 10^{-2}$
0,415	$8,30 \times 10^{-3}$	2,00	$2,80 \times 10^{-2}$
0,450	$9,00 \times 10^{-3}$	2,86	$4,00 \times 10^{-2}$
0,485	$9,70 \times 10^{-3}$	3,86	$5,40 \times 10^{-2}$
0,500	$1,00 \times 10^{-2}$	4,29	$6,00 \times 10^{-2}$

Para os demais procedimentos, 10 mL de uma solução de reagente cromogênico foi preparada semanalmente, pesando-se 0,0128g de dicloridrato de naftiletenodiamina (concentração final $4,80 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) e 0,0511g de ácido sulfanílico (concentração final $2,95 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹), dissolvendo-os juntamente com 6 mL de solução de HCl 0,10 mol L⁻¹ e completando o volume com água deionizada. Portanto, o reagente cromogênico utilizado no desenvolvimento deste método é composto pela mistura de

naftiletenodiamina, ácido sulfanílico e ácido clorídrico, em suas devidas concentrações. Este reagente não foi armazenado por mais do que 5 dias.

c) Solução de dodecil sulfato de sódio em meio aquoso: pesou-se 29,13g de dodecil sulfato de sódio, diluiu-se com água deionizada e transferiu-se quantitativamente para balão de 1000 mL completando-se o volume em seguida, obtendo-se assim a concentração final de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Alíquotas dessa solução foram tomadas e adequadamente diluídas de modo a se obterem as concentrações finais necessárias para a realização de alguns testes preliminares.

d) Solução de hexacianoferrato de potássio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$: esta solução foi preparada a partir da dissolução de 5,28g de soluto com água deionizada em balão volumétrico de 50 mL.

e) Solução de acetato de zinco $1,00 \text{ mol L}^{-1}$: esta solução foi preparada a partir da dissolução de 10,98g de acetato de zinco com água deionizada em balão volumétrico de 50 mL.

V.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

V.2.1 *Spot test*

Para a realização dos *spot tests*, as soluções foram adicionadas ao papéis de filtro, cortados em forma de quadrados, de aproximadamente 2 cm^2 , com uma haste em um dos lados. Os papéis eram manuseados por meio desta haste. As soluções foram adicionadas com o auxílio de um suporte, mostrado na Figura 3, desenvolvido por TUBINO, ROSSI E MAGALHÃES, em 1997⁹⁰.

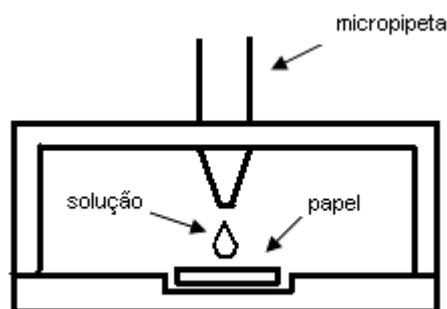


Figura 3. Suporte utilizado na realização dos *spot tests* (Baseado em: TUBINO; ROSSI; MAGALHÃES, 1997).

Os papéis eram dispostos horizontalmente na base do suporte e, acima deles, uma micropipeta era encaixada para a adição das soluções ao centro dos papéis de filtro.

Para a confecção dos *spot tests*, o seguinte procedimento foi adotado: inicialmente, adicionou-se 30 μL da solução de reagente cromogênico ao papel que, em seguida, foi seco durante 2 minutos, com o auxílio de um secador de cabelos ou ar comprimido. Posteriormente, 30 μL da solução contendo o nitrito foram adicionados logo depois da secagem do papel e o spot colorido foi levado ao reflectômetro após, pelo menos, 15 minutos da sua confecção. Os sinais de reflectância foram medidos em 532nm.

V.2.1.1 Estudo da estabilidade óptica

Um estudo da estabilidade óptica do produto colorido foi realizado tomando-se medidas de reflectância do *spot test* em intervalos regulares de 5 minutos, durante 1 hora, sendo a primeira medida tomada alguns segundos após a sua confecção.

Outra verificação da estabilidade foi feita, mantendo-se os três papéis em dessecador com atmosfera de nitrogênio, por mais quatro dias. As medidas foram tomadas em intervalos regulares de 24 horas.

V.2.2 Análise de águas doces superficiais

Foi realizada a determinação de nitrito em duas amostras de águas superficiais, provenientes de rios do estado de São Paulo. As amostras foram armazenadas em refrigerador, mantidas a 4°C antes das análises, segundo protocolo fornecido pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater¹⁰⁴.

Realizou-se uma filtração, com membranas de 0,45 µm de poro (Millipore), em cada uma das amostras para a exclusão de material particulado previamente às análises.

V.2.3 Análise de amostras de alimento

Realizou-se a análise de uma amostra de salsicha adquirida em um supermercado de Araraquara-SP, nos meses de fevereiro de 2008.

A amostra foi triturada em liquidificador até a obtenção de uma massa homogênea, antes de ser submetida ao processo de extração, conforme protocolo descrito pela AOAC International¹⁰⁵.

Primeiramente, foi determinada a concentração de nitrito residual presente na amostra e, em seguida, foi feito um estudo de adição e recuperação de padrão, no qual a amostra foi fortificada com $1,09 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

de padrão de nitrito (50 mg kg^{-1}) antes de ser submetida ao processo de extração. A solução do extrato foi, então, diluída até que se obtivessem as concentrações teóricas de $5,43 \times 10^{-5}$ ($2,50 \text{ mg kg}^{-1}$) e $1,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($5,00 \text{ mg kg}^{-1}$) de nitrito. A partir destas duas concentrações foi realizado o estudo de recuperação na amostra.

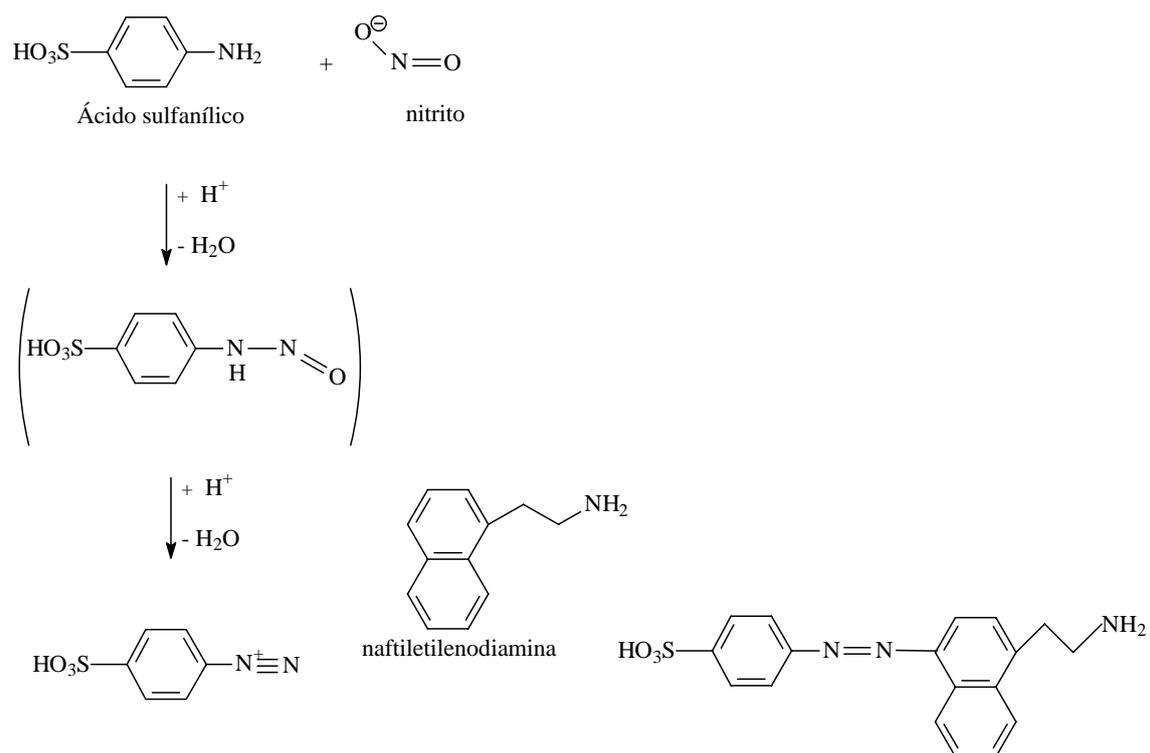
V.2.3.4 Extração do nitrito da matriz e clarificação do extrato

A uma porção, previamente triturada, de aproximadamente 5,00g de amostra, 40 mL de água deionizada pré-aquecida a $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ foram adicionados. A mistura foi aquecida em banho-maria em ebulição durante 15 minutos. Após esfriar, foram adicionados 2,00 mL de hexacianoferrato de potássio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e 2,00 mL de acetato de zinco $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para clarificação do extrato, conforme descrito na literatura^{3,34}. A mistura permaneceu em repouso por 30 minutos, foi transferida para balão de 100 mL, seu volume completado com água deionizada e, em seguida, filtrada em funil de Buchner com papel de filtro qualitativo Whatman. Uma segunda etapa de filtração foi realizada, utilizando-se membranas Durapore hidrofílicas (Millipore), de $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro de poro, a fim de se reduzir a concentração das moléculas de gordura presentes na solução.

Capítulo VI. Resultados e Discussão

VI.1 Spot test

A maioria dos procedimentos espectrofotométricos para determinação de nitrito baseia-se no método de Griess, o qual consiste na reação entre o nitrito e uma amina aromática em solução ácida para formar um sal de diazônio intermediário (diazotação). Em seguida, ocorre o acoplamento do íon diazônio com um composto aromático que possua um grupo substituinte amino ou uma hidroxila, formando o azo composto colorido¹. A reação de diazotação é específica para o nitrito e estritamente dependente da presença de ácido⁷⁰ e, em termos de mecanismo, representa uma substituição eletrofílica aromática com o íon diazônio (formado pelo ácido sulfanílico, por exemplo) sendo o agente eletrofílico e a segunda amina aromática (NED, por exemplo) sendo a base nucleofílica. O ataque eletrofílico do íon diazônio ocorre na posição *para* em relação ao grupo amino da base aromática (agente de acoplamento) (Esquema 1).



Esquema 1: Representação da reação de Griess, com os reagentes ácido sulfanílico e naftiletilenodiamina.

No ensaio de Griess original, publicado em 1879, foram utilizados o ácido sulfanílico para a etapa de diazotação e a α -naftilamina para a etapa de acoplamento, os quais produziram, juntamente com o nitrito, um composto altamente solúvel em água, de cor roxa-avermelhada.

Porém, o uso do reagente naftiletilenodiamina, anos mais tarde, apresentou algumas vantagens frente a outros agentes de acoplamento, tanto em termos de reprodutibilidade como no aumento da sensibilidade, velocidade da reação de acoplamento e da solubilidade do azo-composto formado⁷⁰.

Experimentos preliminares realizados em nosso laboratório demonstraram a formação de um produto colorido (roxo) após a reação do nitrito com ácido sulfanílico e dicloridrato de naftiletilenodiamina, em meio ácido sobre a superfície do papel de filtro. A Figura 4 mostra o espectro de reflectância do produto colorido formado, com valor máximo de A_R (intensidade para a medida de reflectância) em 532nm.

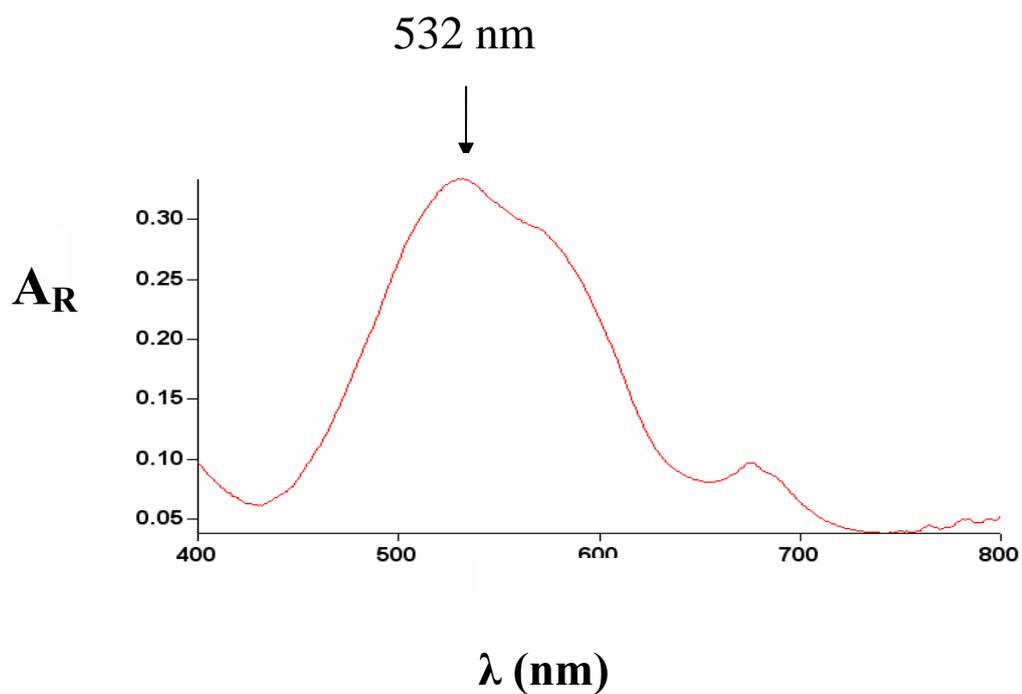


Figura 4. Espectro de reflectância da reação de *spot test* no papel de filtro entre nitrito, naftiletenodiamina e ácido sulfanílico em meio ácido. Valores de A_R foram obtidos após o papel secar ao ar por 15 minutos. O valor máximo de A_R está em 532 nm. Concentração de nitrito = $2,17 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

É interessante ressaltar que a ordem de adição dos reagentes tem fundamental importância na intensidade da coloração de algumas manchas. Tentativas de se obter o *spot test* com a adição de cada reagente separadamente resultaram em manchas disformes e de coloração indefinida, o que prejudicaria a precisão das medidas. Quando se adicionou primeiramente o analito e em seguida a solução reagente, a coloração roxa esperada não apareceu. O que se obteve foi uma mancha disforme e esbranquiçada, sendo também esta opção de adição, descartada. Verificou-se que o spot apropriado para as medidas é obtido somente quando todos os reagentes são misturados em uma única solução e adicionados ao papel antes da adição do analito, formando ao fim da reação e depois de seco o papel, uma mancha bastante uniforme.

Com o objetivo de se verificar a importância da acidez do meio para a reação, um segundo teste foi realizado. Prepararam-se quatro soluções de reagentes cromogênicos, nas quais as concentrações dos reagentes foram mantidas constantes, e somente o ácido clorídrico teve sua concentração variada em quatro níveis diferentes. Para esta verificação, foi utilizado padrão de nitrito em três concentrações diferentes (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de A_R obtidos para as diferentes concentrações de ácido clorídrico nas soluções reagentes, testadas com três valores de concentração de nitrito, cada uma.

[HCl] (mol L ⁻¹)	[NO ₂ ⁻] (mol L ⁻¹)	A_R^a
$6,00 \times 10^{-2}$	$2,17 \times 10^{-5}$	0,034
	$4,35 \times 10^{-4}$	0,198
	$2,61 \times 10^{-3}$	0,510
$1,20 \times 10^{-1}$	$2,17 \times 10^{-5}$	0,034
	$4,35 \times 10^{-4}$	0,194
	$2,61 \times 10^{-3}$	0,516
$2,40 \times 10^{-1}$	$2,17 \times 10^{-5}$	0,033
	$4,35 \times 10^{-4}$	0,189
	$2,61 \times 10^{-3}$	0,525
$3,60 \times 10^{-1}$	$2,17 \times 10^{-5}$	0,020
	$4,35 \times 10^{-4}$	0,168
	$2,61 \times 10^{-3}$	0,510

^a:Média de três replicatas.

Verificou-se que os valores de A_R podem ser considerados constantes para as concentrações entre $6,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $1,20 \times 10^{-1}$ e $2,40 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorídrico, pois a diferença existente entre elas é negligenciável. Porém, para a concentrações de HCl igual a $3,60 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, observou-se uma pequena queda nos valores das medidas, indicando que um excesso de ácido no meio reacional pode diminuir o limite de quantificação do método.

Diante da existência de uma faixa de concentrações de ácido, na qual as medidas de reflectância praticamente mantêm-se constantes e, sendo essas concentrações muito baixas, optou-se por trabalhar, a partir de então, com a concentração mais baixa de ácido entre as quatro testadas, o que permite economizar reagentes e tornar o método mais limpo.

De acordo com WENDLANDT E HECHT (1966) a cor do *spot test* deve ser uniforme sobre toda a superfície sólida para se obter melhor precisão das medidas de reflectância⁸⁸. Neste sentido, cabe ressaltar que para a elaboração dos *spot tests* envolvidos no método desenvolvido neste trabalho levou-se em consideração alguns detalhes, tais como: ordem e velocidade de adição das soluções, qualidade do papel de filtro utilizado e volume das soluções adicionadas. Todos estes detalhes mostraram ser importantes para a uniformidade da cor do *spot test* e, conseqüentemente, para a obtenção de boa precisão das medidas de reflectância. A escolha do volume adicionado aos papéis (30 μL) foi feita baseando-se no tamanho do *spot test* resultante. O diâmetro final adquirido pela mancha nessas condições permitiu que o feixe de radiação emitido pelo reflectômetro incidisse no centro do *spot test*.

VI.2 Planejamento de experimentos

Estudos foram realizados para se avaliar as condições mais favoráveis para a reação de Griess, de modo a se obter uma coloração mais intensa da mancha, em 532nm. Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta para que a superfície obtida indicasse uma condição ótima para a reação. Esta condição foi alcançada empregando-se um planejamento composto central, através do qual os dois fatores estudados, concentração de dicloridrato de naftiletilediamina e de ácido sulfanílico, foram avaliados em cinco níveis. A Tabela 6 mostra as variáveis codificadas e os valores das concentrações em cada nível.

Tabela 6. Fatores estudados no planejamento composto central, em seus respectivos níveis.

Níveis	Fatores	
	Concentração de NED (mol L ⁻¹)	Concentração de ácido sulfanílico (mol L ⁻¹)
+√2	1,00 × 10 ⁻²	6,00 × 10 ⁻²
+1	9,70 × 10 ⁻³	5,40 × 10 ⁻²
0	9,00 × 10 ⁻³	4,00 × 10 ⁻²
-1	8,30 × 10 ⁻³	2,80 × 10 ⁻²
-√2	8,00 × 10 ⁻³	2,00 × 10 ⁻²

Na realização do planejamento foram necessários 13 experimentos. A matriz experimental utilizada está mostrada na Tabela 7.

Tabela 7. Matriz experimental do planejamento composto central, juntamente com os resultados experimentais obtidos. Solução padrão de nitrito $2,17 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Ensaio	Variáveis não codificadas em seus níveis		Variáveis codificadas em seus níveis		A _{R532nm}
	[NED] (mol L ⁻¹)	[ácido Sulfanílico] (mol L ⁻¹)	Fator A	Fator B	
1	$1,00 \times 10^{-2}$	$4,00 \times 10^{-2}$	1,41	0	0,438
2	$8,00 \times 10^{-3}$	$4,00 \times 10^{-2}$	-1,41	0	0,446
3	$9,70 \times 10^{-3}$	$2,80 \times 10^{-2}$	1	-1	0,390
4	$8,30 \times 10^{-3}$	$5,40 \times 10^{-2}$	-1	1	0,486
5	$8,30 \times 10^{-3}$	$2,80 \times 10^{-2}$	-1	-1	0,449
6	$9,70 \times 10^{-3}$	$5,40 \times 10^{-2}$	1	1	0,504
7	$9,00 \times 10^{-3}$	$4,00 \times 10^{-2}$	0	0	0,470
8	$9,00 \times 10^{-3}$	$4,00 \times 10^{-2}$	0	0	0,479
9	$9,00 \times 10^{-3}$	$4,00 \times 10^{-2}$	0	0	0,472
10	$9,00 \times 10^{-3}$	$6,00 \times 10^{-2}$	0	1,41	0,460
11	$9,00 \times 10^{-3}$	$4,00 \times 10^{-2}$	0	0	0,473
12	$9,00 \times 10^{-3}$	$4,00 \times 10^{-2}$	0	0	0,483
13	$9,00 \times 10^{-3}$	$2,00 \times 10^{-2}$	0	-1,41	0,405

A Figura 5 mostra a superfície de resposta obtida. A região mais escura do gráfico representa a região de valores ótimos das variáveis estudadas, para as quais o valor de reflectância é maior.

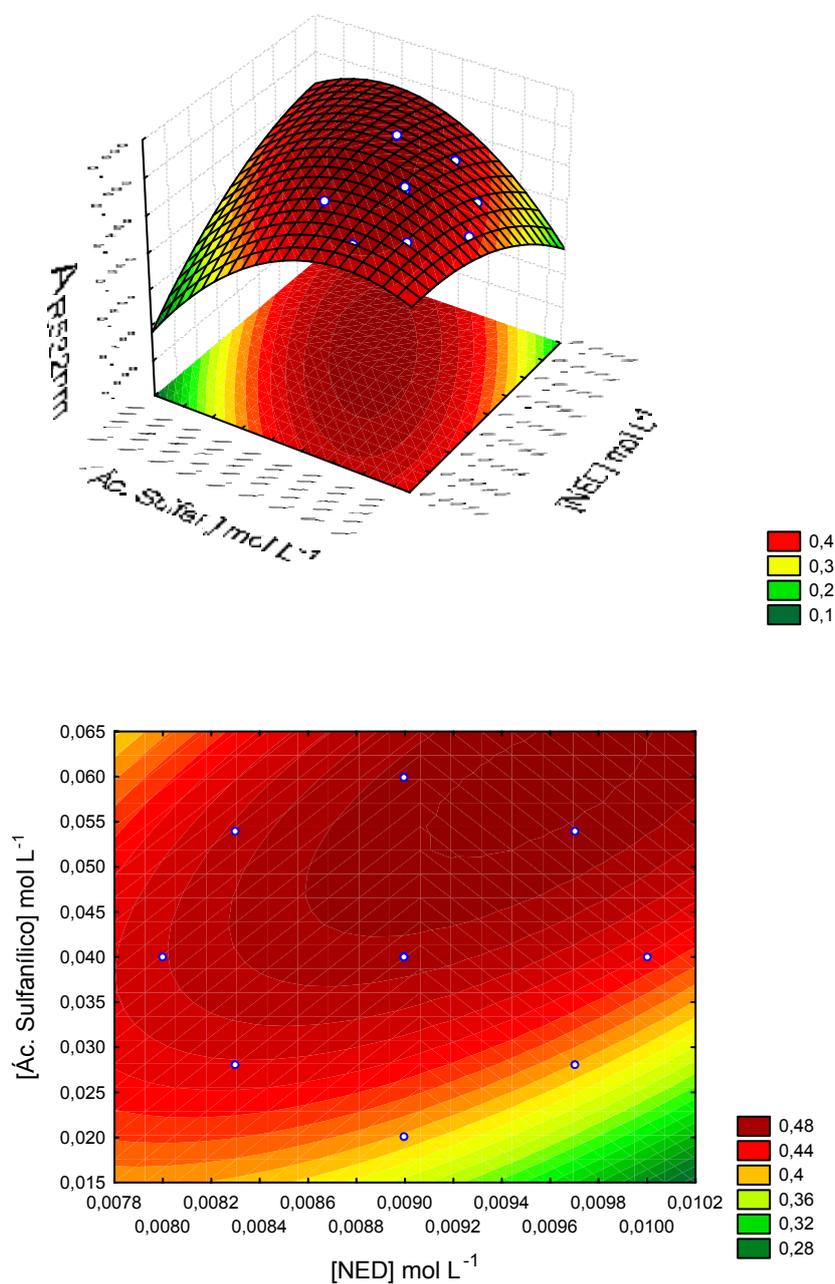


Figura 5. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para a medida de reflectância em 532 nm em função das variáveis: concentração de NED (mol L⁻¹) e concentração do ácido sulfanílico (mol L⁻¹).

O modelo matemático mostrou como valores ótimos as seguintes concentrações: $9,60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o dicloridrato de naftiletenodiamina e $5,90 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para o ácido sulfanílico. Nota-se que este modelo sugere um excesso de ácido sulfanílico, apesar de a reação ser equimolar. Isto pode ser explicado pelo fato de que, estando o ácido sulfanílico em excesso, há a garantia de que todo o nitrito disponível no meio irá reagir para formar o íon diazônio, o que constitui a primeira etapa da reação. Se o ácido sulfanílico não estiver em excesso, uma parte significativa de íons nitrito pode permanecer inerte na solução aquosa, e uma quantidade menor de íon diazônio pode ser formada e, conseqüentemente uma menor quantidade de moléculas do produto colorido, diminuindo-se assim a intensidade da coloração do *spot test*.

VI.3 Estabilidade óptica

No estudo da estabilidade óptica, verificou-se que o produto colorido é estável por pelo menos uma hora, a partir de 10 minutos passados de sua confecção, como pode ser visto pela Figura 6.

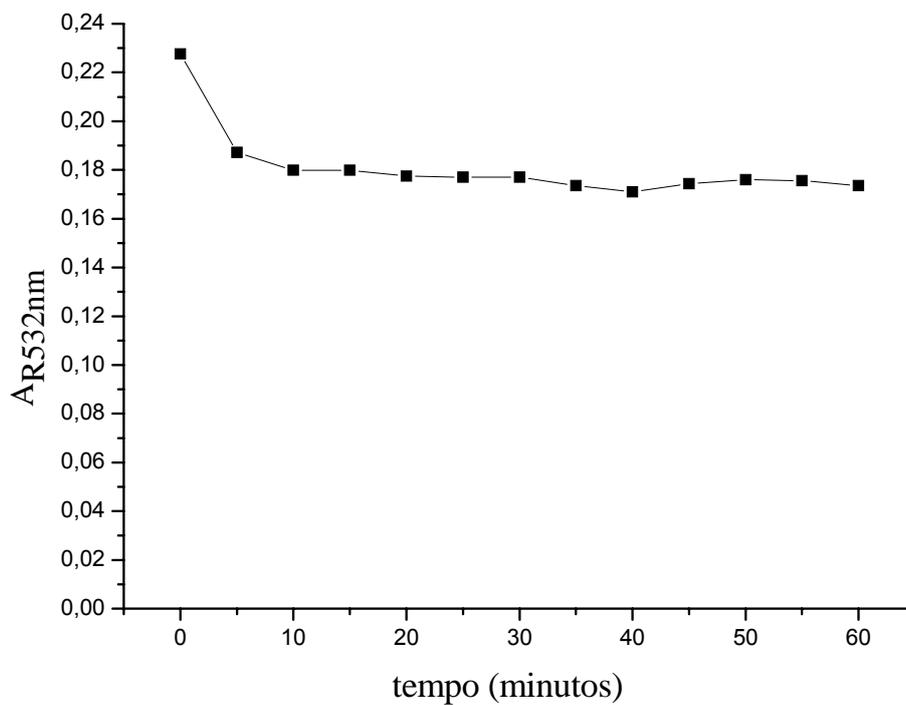


Figura 6. Gráfico mostra a estabilidade óptica do produto colorido a partir de 10 minutos até 60 minutos depois de feito o *spot test*.

Em um segundo estudo da estabilidade óptica, no qual os papéis foram mantidos sob atmosfera de nitrogênio durante 4 dias, verificou-se que o produto colorido é estável por pelo menos 72 horas, como mostram os valores da Tabela 8.

Tabela 8. Valores médios de reflectância, seus respectivos desvios-padrão e desvios-padrão relativos para os *spot tests* medidos em intervalos regulares de 24 horas.

Até 72 horas (três dias):			
	A_R médio	SD	RSD
Branco	0,067	$2,76 \times 10^{-4}$	0,41%
Papel 1	0,162	$1,16 \times 10^{-3}$	0,70%
Papel 2	0,165	$1,21 \times 10^{-3}$	0,73%
Papel 3	0,152	$1,54 \times 10^{-3}$	1,02%
Até 96 horas (4 dias):			
	A_R médio	SD	RSD
Branco	0,070	$6,32 \times 10^{-3}$	8,99%
Papel 1	0,158	$1,61 \times 10^{-2}$	10,23%
Papel 2	0,155	$1,84 \times 10^{-2}$	11,85%
Papel 3	0,145	$1,31 \times 10^{-2}$	9,05%

Observa-se pela tabela que os valores de desvio-padrão e desvio-padrão relativo tornam-se muito altos a partir de 96 horas, demonstrando uma queda na estabilidade óptica do produto colorido. Por outro lado, os valores estatísticos obtidos das medidas feitas em até 72 horas a partir da confecção do *spot test* mostraram que há estabilidade óptica do produto colorido durante todo este intervalo de tempo, e que, portanto, ele pode ser armazenado por até 3 dias para a tomada de medidas precisas e confiáveis.

Os altos valores de RSD, obtidos a partir de 96 horas passadas da confecção dos *spot tests*, não podem ser considerados como totalmente inadequados para fins analíticos, pois existem situações de análises de rotina para as quais estes valores de precisão são satisfatórios, levando também à obtenção de resultados confiáveis.

VI.4 Curva analítica

A Figura 7 apresenta a curva analítica obtida com padrões de nitrito nas concentrações entre $2,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,74 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Uma relação linear ($r = 0,997$) foi obtida pela representação gráfica de A_R versus o logaritmo da concentração de nitrito (mol L^{-1}). O fator 10^5 foi usado para ajustar a curva analítica com valores de log maiores do que zero. Valores de A_R para esta faixa de concentração foram ajustados pela equação: $A_R = -0,5365 + 0,4616 \times C$, onde $C = \log [\text{nitrito}] \times 10^5 (\text{mol L}^{-1})$.

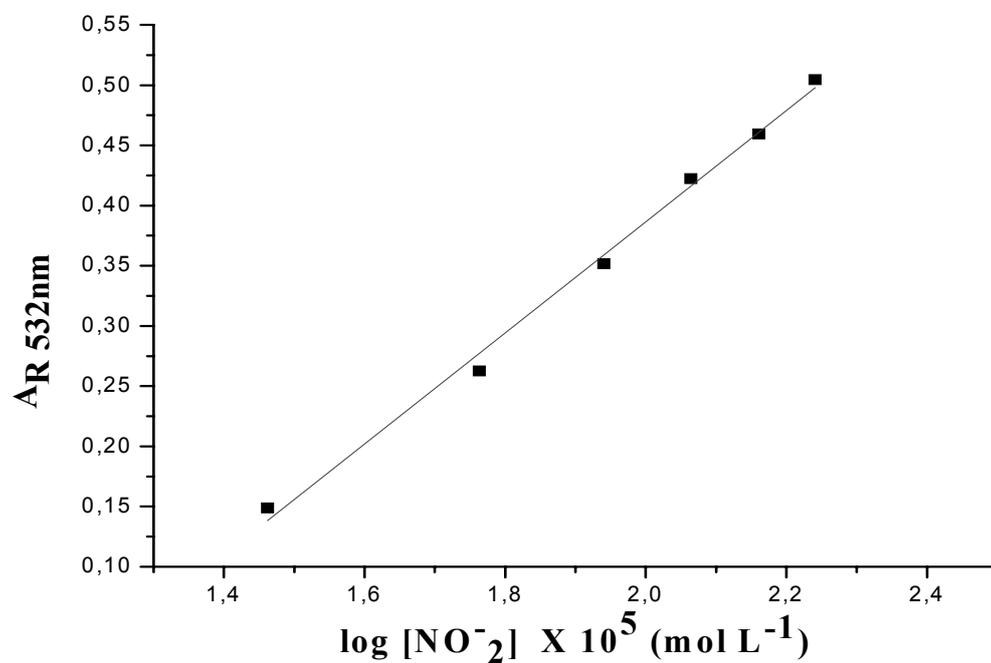


Figura 7. Curva analítica. Concentrações das soluções padrão de nitrito: $2,90 \times 10^{-4}$ a $1,74 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Cada ponto representa a média de três replicatas. Coeficiente de correlação linear: $(r) = 0,997$. Equação da reta: $A_R = -0,5365 + 0,4616 \times C$.

Com o intuito de trabalhar com concentrações ainda menores do analito, os reagentes foram diluídos até que as suas concentrações finais fossem $2,95 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o ácido sulfanílico e NED, respectivamente (exatamente metade das concentrações encontradas no planejamento composto central). A concentração de ácido clorídrico foi mantida constante. Sob essas condições, uma nova curva analítica foi construída, mostrando uma relação linear ($r = 0,997$) na faixa de concentrações entre $7,17 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,35 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de padrões de nitrito (Figura 8). Tal curva forneceu a seguinte equação da reta: $A_R = 0,0224 + 541,47 \times C$, onde A_R é a intensidade óptica de reflectância e C é a concentração de nitrito em mol L^{-1} . O limite de detecção¹⁰⁵ foi $1,61 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \left(\frac{3 \times DP_B}{a} \right)$, e o limite de quantificação¹⁰⁵ $5,36 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \left(\frac{10 \times DP_B}{a} \right)$, sendo $a =$ coeficiente angular da curva analítica e $DP_B =$ desvio padrão do branco para 10 repetições.

Não foram observadas diferenças significativas nas medidas de reflectância obtidas pelo acessório de reflectância da Varian e pelo reflectômetro portátil da Ocean Optics.

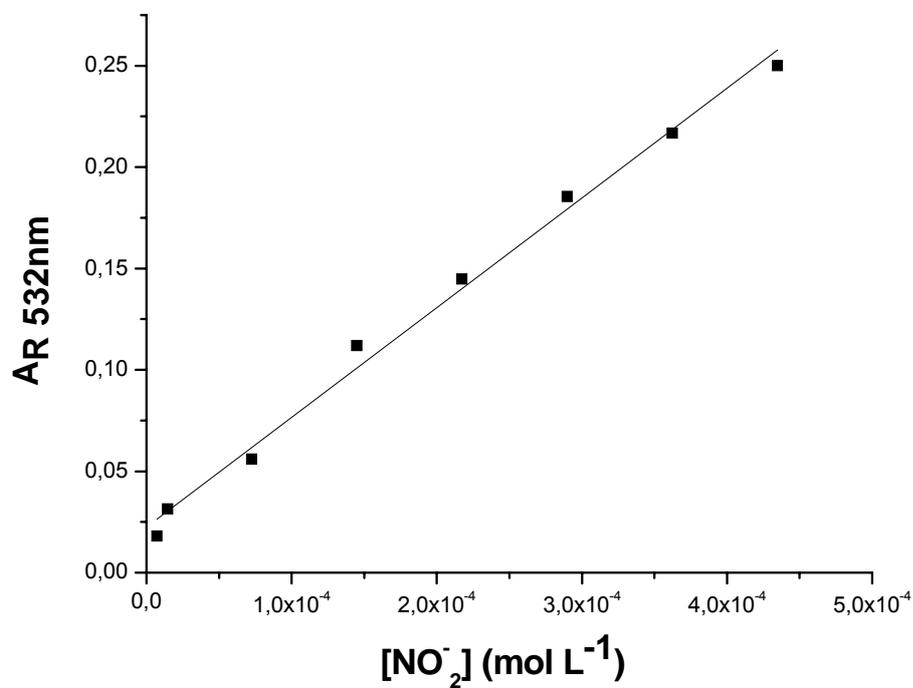


Figura 8. Curva analítica. Faixa de concentrações das soluções de padrão de nitrito: $7,17 \times 10^{-6}$ a $4,35 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Cada ponto foi analisado em triplicata. Coeficiente de correlação linear (r) = 0,997. Equação da reta: $A_R = 0,0224 + 541,47 \times C$.

VI.5 Análise de águas superficiais

A determinação de nitrito em amostras ambientais é muito importante, pois contribui para a averiguação dos níveis de eutrofização de águas naturais e de salificação gradual de aquíferos¹⁸. Dessa forma, o método desenvolvido foi aplicado à análise de duas amostras fortificadas de águas superficiais de rios do estado de São Paulo (Ribeirão dos Porcos, amostra A, e rio Fucsi, amostra B). Os resultados foram comparados com os obtidos pelo método espectrofotométrico para determinação de nitrito em amostras de águas naturais, descrito pelo Standard Methods of Analysis of Water and Wastewater, e são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados da recuperação de nitrito adicionado a amostras de águas superficiais.

Amostra	Nitrito adicionado (mg L ⁻¹)	Método proposto		Método oficial	
		Nitrito encontrado ^a (mg L ⁻¹)	Rec. ^b (%)	Nitrito encontrado ^a (mg L ⁻¹)	Rec. ^b (%)
A	0,50	0,53 ± 0,13	106,0	0,52 ± 0,01	104,0
	1,00	0,98 ± 0,05	98,0	0,95 ± 0,01	95,0
B	0,50	0,57 ± 0,05	114,0	0,51 ± 0,01	101,8
	1,00	0,94 ± 0,00	94,0	0,95 ± 0,01	95,4

^a: Média ± Desvio padrão (D.P.), n=3;

^b: Recuperação.

Recomenda-se que as análises de água sejam realizadas o mais rapidamente possível após a coleta, porque contêm grande número de substâncias que se decompõem rapidamente, formando outros produtos dentro da matriz e podem, ainda, sofrer contaminação por bactérias. As adições de $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,17 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) de nitrito foram realizadas um dia após a coleta do material, e forneceram valores de recuperação que variaram entre 94,0 e 98,0%. Para destacar a importância da preservação da amostra foi feita nova adição de padrão ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$ ou $1,09 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) após trinta dias passados da coleta do material. Os resultados obtidos desta segunda adição foram bastante diferentes dos primeiros. As recuperações, neste caso, variaram entre 101,8 e 114,0%, sendo que a amostra B forneceu um resultado inaceitável do ponto de vista analítico (114,0%).

Neste estudo foi verificado que as amostras de água não podem ser armazenadas por longos períodos, sem que a sua composição sofra alterações significativas. Mesmo mantendo-as refrigeradas, os resultados obtidos em curto período de tempo após a coleta são muito discrepantes daqueles obtidos em adições realizadas após um mês da coleta do material.

VI.6 Análise de amostras de alimento

Uma amostra de salsicha foi analisada pelo método proposto. O resultado desta análise foi comparado com o resultado obtido pelo método espectrofotométrico descrito pela AOAC International. Este método também utiliza o ensaio de Griess para determinação de nitrito, e a absorbância do produto colorido é lida em 540 nm. A precisão e exatidão do método proposto

foram avaliadas através da aplicação dos testes F e t, respectivamente e os resultados são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Determinação de nitrito em amostra de salsicha.

Amostra	Concentração de nitrito (mg kg ⁻¹)		t-valor (2,78) ^b	F-valor (19,00) ^b
	Método oficial ^a	Método proposto ^a		
A	0,71 ± 0,10	0,70 ± 0,06	0,15	2,78

^a: Média ± desvio padrão (D.P.), n = 3;

^b: Valores críticos de t e F para o nível de confiança de 95%.

Na amostra A, a análise realizada pelo método de reflectância difusa forneceu $1,54 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (0,71 mg kg⁻¹) de nitrito e, a análise pelo método oficial, $1,52 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (0,70 mg kg⁻¹). Pelos valores obtidos no teste t verificou-se que o método possui exatidão satisfatória quando aplicado à análise deste tipo de amostra. O desvio-padrão observado no resultado do método proposto (0,06 mg kg⁻¹ ou $2,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) é aceitável e forneceu um resultado satisfatório quando enquadrado no teste F, demonstrando que a análise foi suficientemente precisa.

Objetivando-se avaliar os possíveis efeitos de matriz, foi realizado um estudo de adição e recuperação de padrões de nitrito na amostra. Os resultados estão apresentados na Tabela 11. Os valores de recuperação (n = 3) variaram de 99,3 a 104,1%, com desvios padrão relativos entre 8,1 e 9,0.

Tabela 11. Resultados de recuperação de nitrito adicionado às amostras de salsichas.

Amostra	Valor adicionado ^a (mg kg ⁻¹)	Valor encontrado ^a (mg kg ⁻¹)	Recuperação ^a (% ± RSD)
	-	0,70 ± 0,06	-
A	2,50	3,33 ± 0,27	104,1 ± 8,1
	5,00	5,66 ± 0,51	99,3 ± 9,0

^a: Média ± Desvio padrão (D.P.), n = 3.

Ótimos valores de recuperação foram obtidos, porém os altos valores de desvios padrão relativos indicam a provável presença de substâncias orgânicas dissolvidas no extrato, que comumente interferem nos métodos colorimétricos para análise de nitrito em amostras de alimentos^{1,38}. Estas substâncias são as gorduras e as proteínas que os reagentes clarificantes do extrato (acetato de zinco e hexacianoferrato de potássio) não são capazes de precipitar inteiramente¹⁰⁷. Por serem moléculas maiores, elas apresentam velocidade de difusão menor do que os íons nitrito, e por isso, percorrem uma distância menor no spot test quando uma alíquota do extrato é adicionada ao papel, concentrando-se, portanto no centro do spot. O íon nitrito, por outro lado, é uma pequena molécula, que possui maior velocidade de difusão e percorre maiores distâncias. Dessa forma, quando o spot teste é confeccionado, forma-se uma mancha redonda, cujo centro possui coloração branca (moléculas de gorduras e proteínas não reagem com os reagentes de Griess), e borda roxa.

A mancha obtida desta maneira não fornece valores muito precisos de reflectância. Para aumentar a precisão do método reflectométrico é necessário investigar um procedimento mais eficiente para extração da matéria orgânica dissolvida no extrato e eliminar, assim, a sua interferência. Outros interferentes comumente descritos na literatura são: ascorbato, eritorbato, glicose, NADH e cisteína¹⁰⁷.

No entanto, os altos valores de desvio-padrão relativo não indicam que o método não possa ser usado para análises de rotina, com satisfatória confiabilidade, pois considerando-se a complexidade da matriz esses valores são aceitáveis. A alta dispersão dos dados é considerada um problema somente quando a quantidade de nitrito que é investigada está muito próxima do limite permitido pela legislação. No caso da amostra investigada no presente trabalho, os valores dos desvio-padrão relativos não influenciaram de forma significativa no resultado final, porque a quantidade de nitrito presente está muito abaixo do limite máximo descrito na legislação (150 mg kg^{-1}), o que quer dizer que, com certeza, esta amostra está dentro dos limites legais.

Capítulo VII: Conclusões

Neste trabalho, foi desenvolvido um método por espectroscopia de reflectância difusa combinada com *spot test* que mostrou-se eficiente para a análise de nitrito em amostras de águas superficiais, podendo ser aplicado à realização de análises *in situ*.

O método foi também aplicado à análise de nitrito em uma amostra de salsicha e a concordância dos resultados obtidos pelo método proposto e o oficial pôde ser observada. Entretanto, no estudo da adição de padrão, obtiveram-se valores de desvios padrão relativos altos, o que demonstra ser necessário ainda um estudo de procedimentos mais eficientes para a extração da matéria orgânica dissolvida no extrato, uma vez que a sua presença interfere nas análises pelo método proposto. No entanto, mesmo com dispersão relativamente alta dos valores de reflectância, o método mostrou-se eficiente para a análise de amostras de salsichas, desde que a quantidade investigada não esteja muito próxima do limite máximo permitido pela legislação.

Esta nova metodologia demonstrou ainda simplicidade de execução e grande economia de reagentes, gerando mínima quantidade de resíduos. As soluções estoque podem ser armazenadas em refrigerador por, pelo menos, uma semana e as soluções de trabalho podem ser preparadas em balões volumétricos de 2,00 mL, visto que o volume total necessário para um conjunto de análises é muito pequeno. Além disso, a concentração do ácido clorídrico utilizada para a reação é bastante inferior frente a outras metodologias que também utilizam a reação de Griess para a determinação de nitrito, e não há necessidade de resfriamento do meio reacional. Este procedimento de análise

pode ser, portanto, facilmente implementado em laboratórios de análises de rotina.

Estas características incluem o método reflectométrico no conjunto dos novos métodos analíticos, que estão de acordo com os princípios preconizados pela Química Verde, sendo, portanto, uma ótima opção para análises de rotina de águas naturais e alimentos.

Capítulo VIII. Perspectivas Futuras

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, observa-se a necessidade de dar prosseguimento à pesquisa aqui iniciada. Surgem, assim, algumas perspectivas em relação à continuidade deste estudo, tais como:

- a) A realização de estudo visando a eliminação dos interferentes presentes nas amostras mais complexas de salsicha;
- b) A verificação da viabilidade da aplicação do método proposto à determinação de nitrito em amostras de urina, uma vez que a presença deste íon é um indicador da ocorrência de infecção do trato urinário;
- c) O aumento da sensibilidade do método, através da substituição dos reagentes cromogênicos por outros menos tóxicos.

Capítulo IX. Referências

- 1 MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v. 54, p. 785-803, 2001.
- 2 OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996, p.434.
- 3 ANDRADE, R. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de nitrato, nitrito e N-nitrosaminas em produtos cárneos**. 2004. 172 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- 4 VICTORIA, R. L.; PICCOLO, M. C.; VARGAS, A. A. T. O ciclo do nitrogênio. In: _____. **Microbiologia do solo**. Campinas, São Paulo: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992. p. 105-117.
- 5 RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114-1120, 2006.
- 6 ELLIS, G. et al. Nitrite and nitrate analysis: a clinical biochemistry perspective. **Clinical Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 195-220, 1998.
- 7 CEMEK, M. et al. Nitrate and nitrite levels in fruity and natural mineral waters marketed in western turkey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3-4, p. 236-240, 2007.
- 8 SPARKS, D. L. **Environmental soil chemistry**. New York: Academic Press, 1995.
- 9 McKNIGHT, G. M. et al. Dietary nitrate in man: friend or foe? **British Journal of Nutrition**, v. 81, p. 349-358, 1999.
- 10 BRUNIN-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, n. 6, p. 521-538, 1993.
- 11 DUTT, J.; DAVIS, J. Current strategies in nitrite detection and their application to field analysis. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 4, n. 3, p. 465-471, 2002.
- 12 SWANN, P. F. The toxicology of nitrate, nitrite and *N*-nitroso compounds. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 26, p. 1761-1770, 1975.

13 CHUNG, S. Y. et al. Survey of nitrate and nitrite contents of vegetables grown in Korea. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, p. 621-628, 2003.

14 MARTIN, S.; RESTANI, P. Determination of nitrates by a novel ion chromatographic method: occurrence in leafy vegetables (organic and conventional) and exposure assessment for Italian consumers. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, p. 787-792, 2003.

15 KYRIAKIDIS, N. B.; TARANTILI-GEORGIOUS, K.; TSANI-BATZAKA, E. Nitrate and nitrite content of Greek cheeses. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 10, p. 343-349, 1997.

16 MOUSAVI, M. F.; JABBARI, A.; NOUROOZI, S. A sensitive flow-injection method for determination of trace amounts of nitrite. **Talanta**, v. 45, n. 6, p. 1247-1253, 1998.

17 BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 mar. 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 30 maio 2008.

18 BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 1.469, de 29 de dezembro de 2000. Regulamento Técnico de Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 jan. 2001. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=50&word=>>>. Acesso em: 30 maio 2008.

19 SEBRANEK, J. G.; BACUS, J. N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? **Meat Science**, v. 77, n. 1, p. 136-147, 2007.

20 FOX JR, J. B. The chemistry of meat pigments. **Food Processing**, v. 14, n. 3, p. 207-210, 1966.

21 OLIVEIRA, S. M.; LOPES, T. I. M. S.; RANGEL, A. O. S. S. Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in cured meat by sequential injection analysis. **Food Chemistry and Technology**, v. 69, n. 9, p. 690-695, 2004.

22 ENSAFI, A. A.; KAZEMZADEH, A. simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow injection with spectrophotometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 382, n. 1-2, p. 15-21, 1999.

23 ENSAFI, A. A.; DEHAGHEI, G. B. Ultra-trace analysis of nitrite in food samples by flow-injection with spectrophotometric detection. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 363, p. 131-133, 1999.

24 HE, D. Y. et al. Chemiluminescence microflow injection analysis system on a chip for the determination of nitrite in food. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 667-672, 2007.

25 VELASCO-ARJONA, A. et al. Full automated robotic method for the determination of chloride, nitrite and nitrate in cured meat products. **Talanta**, v. 46, p. 969-976, 1998.

26 STILLWELL, W. G. et al. Urinary-excretion of nitrate, *N*-nitrosoproline, 3-methyladenine, and 7-methylguanine in a Colombian population at high-risk for stomach-cancer. **Cancer Research**, v. 51, n. 1, p. 190-194, 1991.

27 SEN, N. P.; BADDOO, P. A. Trends in the levels of residual nitrite in Canadian cured meat products over the past 25 years. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4714-4718, 1997.

28 TANNENBAUM, S. R. et al. DNA damage and cytotoxicity caused by nitric oxide. In: _____. **Nitrosamines and related *N*-nitroso compounds chemistry and biochemistry**. Washington, D. C.: American Chemical Society, 1994. p. 121-131.

29 MASUDA, S. et al. A novel mutagen, 2-(5-hydroxy-4,6-dinitroindolyl) ethanol, formed in the reaction between 5-hydroxytryptamine and nitrite under acid conditions, especially in the presence of *L*-cysteine. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 588, n. 2, p. 172-176, 2005.

30 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 1004, de 11 de dezembro de 1998. Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites de uso para a Categoria 8 - Carnes e Produtos Cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 1998. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=38&word=>>>. Acesso em: 30 maio 2008.

31 PASQUALI, C. E. L.; HERNANDO, P. F.; ALEGRIA, J. S. D. Spectrophotometric simultaneous determination of nitrite, nitrate and ammonium in soils by flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, n. 1-2, p. 177-182, 2007.

32 GALHARDO, C. X.; MASINI, J. C. Sequential injection analysis as a tool for in situ monitoring of Fe(II), Fe(III), NO₃⁻ and NO₂⁻ in natural and waste waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 438, p. 39-48, 2001.

33 SU, X. L. et al. A novel flow-injection system for simultaneous determination of nitrate and nitrite based on the use of a zinc reductor and a bulk acoustic wave impedance detector. **Microchemical Journal**, v. 59, n. 3, p. 341-350, 1998.

34 ANDRADE, R. et al. A flow-injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide generation. **Food Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 597-602, 2003.

35 BURAKHAM, R. et al. Simple flow-injection system for the simultaneous determination of nitrite and nitrate in water samples. **Talanta**, v. 64, p. 1259-1265, 2004.

36 HIRATA, S.; KARTHIKEYAN, S.; KAJIYA, T. Portable flow injection analyser for nitrite and nitrate in natural water. **Analytical Sciences**, v. 20, p. 567-569, 2004.

37 CALATAYUD, J. M.; MATEO, J. V. G.; DAVID, V. Multi-insertion of small controlled volumes of solutions in a flow assembly for determination of nitrate (photoreduction) and nitrite with proflavin sulfate. **The Analyst**, v. 123, p. 429-434, 1998.

38 MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001.

39 RIDNOUR, L. A. et al. A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite and nitrate in cell culture media. **Analytical Biochemistry**, v. 281, p. 223-229, 2000.

40 GIUSTARINI, D. et al. Adaptation of the Griess reaction for detection of nitrite in human plasma. **Free Radical Research**, v. 38, n. 11, p. 1235-1240, 2004.

41 GUEVARA, I. et al. Determination of nitrite/ nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clinica Chimica Acta**, v. 274, p. 177-188, 1998.

42 AYDIN, A.; ERCAN, O.; TASCIOGLU, S. A novel method for the spectrophotometric determination of nitrite in water. **Talanta**, v. 66, n. 5, p. 1181-1186, 2005.

43 RUIZ-CAPILLAS, C.; LER-GUIOTE, P.; JIMENEZ-COLMENERO, F. Application of flow injection analysis to determine protein-bound nitrite in meat products. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 812-816, 2007.

- 44 MELCHERT, W. R.; INFANTE, C. M. C.; ROCHA, F. R. P. Development and critical comparison of greener flow procedures for nitrite determination in natural waters. **Microchemical Journal**, v. 85, n. 2, p. 209-213, 2007.
- 45 KADOWAKI, R.; NAKANO, S.; KAWASHIMA, T. Sensitive flow injection colorimetry of nitrite by catalytic coupling of N-phenyl-p-phenylenediamine with N,N-dimethylaniline. **Talanta**, v. 48, n. 1, p. 103-107, 1999.
- 46 KUZNETSOV, V. V.; ZEMYATOVA, S. V.; ERMOLENKO, Y. V. Flow-injection determination of nitrites based on their reaction with thiocyanates. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 289-296, 2005.
- 47 BAEZA, M.; BARTROLI, J.; ALONSO, J. Autoadaptative sequential injection system for nitrite determination in wastewaters. **Talanta**, v. 68, p. 245-252, 2005.
- 48 BAEZA, M. M. et al. Microflow injection system based on a multicommutation technique for nitrite determination in wastewaters. **The Royal Society of Chemistry**, v. 131, p. 1109-1115, 2006.
- 49 LAPA, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; PINTO, I. V. O. S. Sequential injection analysis-based system for on-line monitoring of nitrite and nitrate in wastewaters. **Analytical Sciences**, v. 16, p. 1157-1160, 2000.
- 50 GAL, C.; FRENZEL, W.; MÖLLER, J. Re-examination of the cadmium reduction method and optimisation of conditions for the determination of nitrate by flow injection analysis. **Mikrochimica Acta**, v. 146, p. 155-164, 2004.
- 51 CASELLA, I. G.; GATTA, M. Electrochemical reduction of NO_3^- and NO_2^- on a composite copper thallium electrode in alkaline solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 568, n. 1-2, p. 183-188, 2004.
- 52 BIAGIOTTI, V. et al. Synthesis and characterization of polymeric films and nanotubule nets used to assemble selective sensors for nitrite detection in drinking water. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 122, n. 1, p. 236-242, 2007.
- 53 WINNISCHOFER, H. et al. Electrocatalytic activity of a new nanostructured polymeric tetra-ruthenated porphyrin film for nitrite detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, n. 1, p. 97-107, 2003.
- 54 LIU, P.; HU, J. Carbon nanotube powder microelectrodes for nitrite detection. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 84, p. 194-199, 2002.

55 DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Sonoelectrochemically enhanced nitrite detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 404, n. 2, p. 241-247, 2000.

56 SEYMOUR, E. H. et al. Indirect electrochemical detection of nitrite via diazotization of aromatic amines. **Mikrochimica Acta**, v. 140, n. 3-4, p. 211-217, 2002.

57 LIU, P.; HU, J. Nitrite reduction in acidic solution at a CG/Eastman-AQ-Os(bpy)₃²⁺ - pvp composite modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 566, p. 423-432, 2004.

58 CUI, Y. et al. Electrochemical determination of nitrite using a gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode prepared by the seed-mediated growth technique. **Analytical Sciences**, v. 23, p. 1421-1425, 2007.

59 ZHAO, G. Y.; XU, C. L.; LI, H. L. Pt-Ru nanowire arrayed electrodes for nitrite detection. **Materials Letters**, v. 62, p. 1663-1665, 2008.

60 SOUZA, A. L. et al. Amperometric sensor for nitrite based on copper tetrasulphonated phthalocyanine immobilized with poly-L-lysine film. **Talanta**, v. 75, p. 333-338, 2008.

61 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.

62 KANDA, Y.; TAIRA, M. Flow-injection analysis method for the determination of nitrite and nitrate in natural water samples using a chemiluminescence NO_x monitor. **Analytical Sciences**, v. 19, n. 5, p. 695-699, 2003.

63 LU, C. et al. Flow-injection chemiluminescent determination of nitrite in water based on the formation of peroxynitrite from the reaction of nitrite and hydrogen peroxide. **Analytica Chimica Acta**, v. 474, p. 107-114, 2002.

64 YUE, Q. L.; SONG, Z. H. Assay of femtogram level nitrite in human urine using luminol-myoglobin chemiluminescence. **Microchemical Journal**, v. 84, n. 1-2, p. 10-13, 2006.

65 NOROOZIFAR, M. et al. Application of manganese(IV) dioxide microcolumn for determination and speciation of nitrite and nitrate using a flow injection analysis-flame atomic absorption spectrometry system. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 359-364, 2007.

66 FERNANDEZ-ARGUELLES, M. T. et al. Flow injection determination of nitrite by fluorescence quenching. **Talanta**, v. 62, n. 5, p. 991-995, 2004.

67 TAKAHAMA, U.; HIROTA, S.; ONIKI, T. Thiocyanate cannot inhibit the formation of reactive nitrogen species in the human oral cavity in the presence of high concentrations of nitrite: detection of reactive nitrogen species with 4,5-diaminofluorescein. **Chemical Research and Toxicology**, v. 19, p. 1066-1073, 2006.

68 SINGH, J. et al. The measurement of nitrite in adulterated urine samples by high-performance ion chromatography. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 23, n. 3, p. 137-140, 1999.

69 ROMITELLI, F. et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **Journal of Chromatography B**, v. 851, p. 257-267, 2007.

70 TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B**, v. 851, p. 51-70, 2007.

71 JOBGEN, W. S. et al. Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 851, p. 71-82, 2007.

72 PELLETIER, M. M. et al. The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: pitfalls and solutions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 541-548, 2006.

73 ABBAS, M. N.; MOSTAFA, G. A. Determination of traces of nitrite and nitrate in water by solid phase spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 410, p. 185-192, 2000.

74 OZTEKIN, N.; NUTKU, M. S.; ERIM, F. B. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 103-106, 2002.

75 TANAKA, Y. et al. Simultaneous determination of nitrite, nitrate, thiocyanate and uric acid in human saliva by capillary zone electrophoresis and its application to the study of daily variations. **Journal of Chromatography A**, v. 1051, p. 193-197, 2004.

76 BASTOS, A. L. et al. Nitrate and nitrite determination in fish skin teas employed for asthma treatment in the southern region of Rio Grande do Sul. **Quimica Nova**, v. 29, n. 5, p. 895-900, 2006.

77 POURHOSSEIN, M.; AMINI, M. K.; TALEBI, M. A simple flow injection spectrophotometric determination of nitrite based on its reaction with thiourea. **Analytical Sciences**, v. 21, p. 661-665, 2005.

78 GOTARDO, M. A. **Desenvolvimento de métodos para análise de medicamentos utilizando reflectância difusa e espectrofotometria**. 2006. 173 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

79 ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: theory and practice**. New York: Oxford University Press, 1998.

80 JUNGREIS, E. **Spot test analysis: clinical, environmental, forensic and geochemical applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

81 MATIAS, F. A. A.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M. Quantitative reflectance spot test for the determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 327-330, 2004.

82 GOTARDO, M. A. et al. Determination of furosemide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Talanta**, v. 64, p. 361-365, 2004.

83 GOTARDO, M. A. et al. Detection of propranolol in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 69, p. 1103-1109, 2008.

84 FEIGL, F. **Spot test in organic analysis**. 5th ed. New York: Elsevier, 1956.

85 ANFT, B. Friedlieb Ferdinand Runge: a forgotten chemist of the nineteenth century. **Journal of Chemical Education**, v. 32, n. 11, p. 566-574, 1955.

86 GAZDA, D. B.; FRITZ, J. S.; PORTER, M. D. Determination of nickel(II) as the nickel dimethylglyoxime complex using colorimetric solid phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 508, n. 1, p. 53-59, 2004.

87 GHAUCH, A. et al. Quantitative measurements of ammonium, hydrogenophosphate and Cu(II) by diffuse reflectance spectrometry. **Talanta**, v. 48, p. 385-392, 1999.

88 WENDLANDT, W. W. M.; HECHT, H. G. **Reflectance spectroscopy**. New York: Interscience Publishers, 1996.

89 KEALEY, D. Quantitative reflectometry I: principles and scope. **Talanta**, v. 19, p. 1563-1571, 1972.

90 TUBINO, M.; ROSSI, A. V.; MAGALHÃES, M. E. A. Quantitative spot tests of Fe(III), Cr(VI) and Ni(II) by reflectance measurements. **Analytical Letters**, v. 30, n. 2, p. 271-282, 1997.

91 GHAUCH, A. et al. Use of diffuse reflectance spectrometry in spot test reactions for quantitative determination of cations in water. **Chemosphere**, v. 40, p. 1327-1333, 2000.

92 WEINERT, P. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. A simplified reflectometric method for the rapid determination of dipyrone in pharmaceutical formulations. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 4, p. 846-854, 2007.

93 TUBINO, M.; SOUZA, R. L. Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations by diffuse reflectance photometry. **Talanta**, v. 68, p. 776-780, 2006.

94 FREI, R. W.; MacNEIL, J. D. **Diffuse reflectance spectroscopy in environmental problem-solving**. Cleveland: CRC Press, 1973.

95 A GUIDE to integrating sphere: theory and applications. New York: Labsphere, 2006.

96 ZAPOROZHETS, O. A.; TSYUKATO, L. Y. Xylenol orange adsorbed on silica surface as a solid phase reagent for lead determination using diffuse reflectance spectroscopy. **Talanta**, v. 58, p. 861-868, 2002.

97 ARENA, M. P.; PORTER, M. D.; FRITZ, J. S. Rapid, specific determination of iodine and iodide by combined solid-phase extraction/diffuse reflectance spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 1, p. 185-190, 2002.

98 MOLINER-MARTINEZ, Y.; HERRAEZ-HERNANDEZ, R.; CAMPINS-FALCO, P. Improved detection limit for ammonium/ammonia achieved by Berthelot's reaction by use of solid-phase extraction coupled to diffuse reflectance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 534, n. 2, p. 327-334, 2005.

99 ZANJANCHI, M. A.; NOEI, H.; MOGHIMI, M. Rapid determination of aluminum by UV-Vis diffuse reflectance spectroscopy with application of suitable adsorbents. **Talanta**, v. 70, p. 933-939, 2006.

100 TUBINO, M.; QUEIROZ, C. A. R. Flow injection visible diffuse reflectance quantitative analysis of nickel. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, p. 199-204, 2008.

101 MOROS, J. et al. Chemometric determination of arsenic and lead in untreated powdered red paprika by diffuse reflectance near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 196-206, 2008.

102 ROSA, S. S. et al. Development and validation of a method for active drug identification and content determination of ranitidine in pharmaceutical products using near-infrared reflectance spectroscopy: a pharmaceutical release approach. **Talanta**, v. 75, p. 725-723, 2008.

103 ALEXAYEV, V. N. **Quantitative analysis**. Moscou: MIR Publishers, 1960.

104 STANDARD Methods for the Examination of Water and Wastewater. Colorimetric Method 4500 - B, 21st ed. New York: American Public Health Association 2005, p. 4-118 - 4-119.

105 AOAC. **Official method 973.31**. 16th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1995. p. 8.

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

107 RINCÓN, F.; MARTINEZ, B.; DELGADO, J. M. Detection of factors influencing nitrite determination. **Meat Science**, v. 65, p. 1421-1427, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)