

## Desenvolvimento de método espectrofotométrico ambientalmente mais limpo para análise de nitrito em salsichas

Ângela Pinheiro Martins, Vitor Hugo Marques Luiz, Leonardo Pezza, Helena Redigolo Pezza<sup>1</sup>

---

**Resumo:** Um método espectrofotométrico ambientalmente mais limpo para a análise de nitrito usando um novo reagente de diazotação é descrito. O método proposto é baseado na reação de diazotação e acoplamento entre nitrito, dapsona e naftiletilenetetramina (NED) em meio de ácido fosfórico à temperatura ambiente. As condições de medidas foram otimizadas por planejamento de experimentos. As medidas espectrofotométricas foram efetuadas em 545 nm e o intervalo linear obtido foi de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$  –  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , com limites de detecção e de quantificação de  $0,99 \times 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$  e  $3,31 \times 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. O método proposto foi aplicado com sucesso na análise de nitrito em salsichas e apresentou concordância com o método oficial.

**Palavras-chave:** nitrito, salsicha, química verde

---

**Abstract:** A clean environmental spectrophotometric method for the analysis of nitrite using a new diazotizing reagent is reported. The proposed method is based on diazotization-coupling reaction between dapsone, nitrite and (naphthyl)ethylenediamine (NED) in phosphoric acid medium at room temperature. Experimental design methodologies were used to optimize the measurement conditions. The spectrophotometric measurements were carried out at 545 nm and the linear range obtained was  $5.0 \times 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$  –  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ , with detection and quantification limits of  $0.99 \times 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$  e  $3.31 \times 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$ , respectively. The proposed method was applied successfully to the analysis of nitrite in sausages and the results obtained by the proposed method were in good agreement with those obtained using the official method.

**Keywords:** nitrite, sausage, green Chemistry

---

<sup>1</sup> Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP -, C.P. 355, 14801-970, Araraquara, SP, Brasil.

## INTRODUÇÃO

O íon nitrito é largamente utilizado em produtos embutidos de carne com a finalidade de preservar e conferir cor a esses produtos. Embora a maioria dos conservantes utilizados em alimentos seja considerada segura para o consumo humano, a presença de nitrito em níveis elevados pode trazer sérios riscos à saúde do consumidor, pois pode atuar como precursor para vários tipos de problemas, como a formação excessiva de metahemoglobina que conduz a efeitos tóxicos como a cianose e à formação de nitrosaminas carcinogênicas [1-3].

Devido à sua larga utilização como conservante em alimentos e riscos inerentes ao seu uso, estudos mais aprofundados deste íon vêm sendo realizados nos anos recentes. Inúmeras questões quanto à sua toxicidade foram levantadas e, como consequência, o teor de nitrito no ambiente e nas amostras alimentares vem sendo controlado na maioria dos países industrializados. No Brasil, o nível de nitrito permitido pela legislação vigente é de 150mg/Kg de  $\text{NaNO}_2$  em produtos cárneos embutidos [4].

Vários métodos para análise de nitrito têm sido propostos na literatura utilizando técnicas diversas, incluindo espectrofotometria [5-8] e procedimentos em fluxo com detecção espectrofotométrica [9-12], quimioluminescência [13], eletroquímica [14, 15], espectrometria de absorção atômica [16], fluorimetria [17], espectroscopia de reflectância difusa [18] e dispositivo analítico em papel microfluídico com detecção colorimétrica [19].

Os métodos espectrofotométricos são os mais largamente utilizados devido ao seu baixo custo, simplicidade de procedimentos e sensibilidade. Dentre os métodos espectrofotométricos, o mais simples e mais frequentemente empregado para análise de nitrito é o método oficial adotado pela AOAC [7,8], baseado na reação de Griess-Illosvay e apresenta boa sensibilidade, além de baixo custo relativo. Na reação de Griess-Illosvay, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido originando um diazo-composto, o qual reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), produzindo um composto de cor vermelha intensa. Entretanto, esse procedimento utiliza grandes quantidades de sulfonamidas, que, segundo estudos, podem causar reações alérgicas em humanos e serem

carcinogênicas, além de elevar o risco de aumento da resistência bacteriana [20].

Com o objetivo de minimizar o uso de reagentes químicos tóxicos e nocivos ao operador e ao meio ambiente em consonância com a filosofia da Química Verde [21], o presente trabalho propõe o desenvolvimento de um método espectrofotométrico ambientalmente mais limpo no qual a sulfonamida é substituída por dapsona (4,4'-diamino-difenil sulfona), reagente que não pertence à classe dos antibióticos e não oferece riscos ao operador e nem ao meio ambiente. O método espectrofotométrico proposto é baseado em medidas do azo-corante produzido ( $\lambda_{\text{max}} = 545 \text{ nm}$ ) a partir da reação entre dapsona, nitrito em meio ácido e NED. As condições experimentais foram otimizadas por planejamento de experimentos e o método proposto foi aplicado na análise de amostras de salsichas.

## PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### Equipamentos e reagentes

As medidas espectrofotométricas foram feitas utilizando o espectrofotômetro de fotodiodo HP 8453, equipado com controlador de temperatura. Nas medidas volumétricas foram empregadas buretas classe A, micropipetas “Gilson” (200 - 1000  $\mu\text{L}$ ) e “Eppendorf” (10-100  $\mu\text{L}$ ). Foi utilizada vidraria de grau A. As pesagens foram realizadas em balança analítica, modelo AG204 e marca Mettler Toledo. Os reagentes utilizados foram: dapsona (DAP) ( $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ , Purifarma, 99%); N-(1-Naphthyl)Ethylenediamine (NED) (NED.2HCl, Sigma-Aldrich, USA, 97%); Ácido Fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Mallinckrodt 85%) e nitrito de Sódio ( $\text{NaNO}_2$ , Merck, Germany, 99%). No preparo das soluções foi utilizada água de alta pureza (resistividade  $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) obtida em sistema de purificação Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA, USA).

### Amostras

A análise de nitrito foi realizada em amostras de salsichas (A, B e C), sendo estas adquiridas em supermercados na cidade de Araraquara, SP.

## Metodologia

As concentrações de  $H_3PO_4$ , de DAP e de NED foram otimizadas através do planejamento fatorial  $2^3$  e superfície de resposta. A superfície de resposta e sua respectiva curva de nível foram adquiridas mediante o planejamento composto central. Para tanto, 13 experimentos foram realizados em 5 níveis ( $+\sqrt{2}$  até  $-\sqrt{2}$ ). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados analisados utilizando o programa *Statistica 6.0*.

Foram preparadas soluções de acordo com o seguinte procedimento: em 13 balões de 10 mL foram adicionados cerca de 5,0 mL de água deionizada, 1,0 mL de Ácido Fosfórico (85%) e diferentes concentrações de DAP e NED (o volume do balão foi completado com água deionizada). Em seguida foram feitas as medidas de absorvância em 545 nm.

## Estabilidade do produto

Um monitoramento cinético dos valores de absorvância a 545 nm foi realizado para avaliar a estabilidade do produto colorido da reação. Neste procedimento, as medidas foram feitas a cada 3 minutos durante uma hora.

## Estudo de interferências

A possível interferência de vários íons ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $NO_3^{2-}$  e  $SCN^-$ ) e ingredientes comumente presentes em produtos cárneos (fosfatos, ascorbato de sódio, ácido cítrico, açúcares (dextrose, maltose, sacarose, amido e gomas) foi avaliada. As soluções contendo  $1\text{ mg.L}^{-1}$  de nitrito e de cada um dos íons em concentrações iguais e 10 vezes maior do que a de nitrito foram avaliadas sob as mesmas condições descritas no procedimento proposto.

## Preparo da amostra e aplicação do método proposto

As amostras foram preparadas segundo recomendações da AOAC [8], que consiste em triturar 5g da amostra (salsicha) e extrair o íon nitrito com água quente, sendo o extrato clarificado pela adição do reagente de Carrez seguido de repouso e filtração através de papel de filtro Whatman n.º. 1 com a finalidade de retirar o material particulado e a gordura. O filtrado foi então diluído de modo a se obter as

concentrações desejadas para a análise pelo método proposto. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos pelo método espectrofotométrico de Griess para a determinação de nitrito em alimentos [8].

## Análise das amostras pelo método de referência

Os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com o método de referência para análise de nitrito em salsichas descrito pelo AOAC [8]. O método colorimétrico de referência consiste na confecção de uma curva analítica com concentrações diluídas de nitrito de sódio a partir de uma solução estoque de  $NaNO_2$  ( $1\text{ mg.L}^{-1}$ ) e posterior análise das amostras nas mesmas condições. O reagente cromogênico do método de referência é constituído de sulfanilamida e NED, ambos em ácido acético 15%, de acordo com a recomendação da AOAC [8], realizando a leitura de absorvância após 15 minutos em 540 nm.

## Adição de padrão e recuperação

Adições de padrão foram realizadas para avaliar a possível interferência da matriz. Foram empregadas três amostras de salsicha e estas foram fortificadas com 0,05 e  $0,10\text{ mg.L}^{-1}$  da solução de nitrito e analisadas nas mesmas condições do método proposto.

?

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de dapsona em substituição a sulfanilamida na reação de Griess é descrita na literatura [18], em estudo no qual foi desenvolvido um método por espectroscopia de reflectância difusa em meio de ácido clorídrico utilizando papel de filtro como suporte sólido. Entretanto, como a reflectância difusa não é largamente difundida e utilizada nos laboratórios de análise como a espectrofotometria, desenvolvemos no presente trabalho um método espectrofotométrico mais limpo para análise de nitrito, utilizando dapsona e ácido fosfórico. A espectrofotometria apresenta requisitos indispensáveis na rotina laboratorial como rapidez, baixo custo operacional e elevada confiabilidade de resultados. Durante a reação de diazotação, é esperado que os grupos  $NH_2$  da dapsona reajam com o nitrito em meio

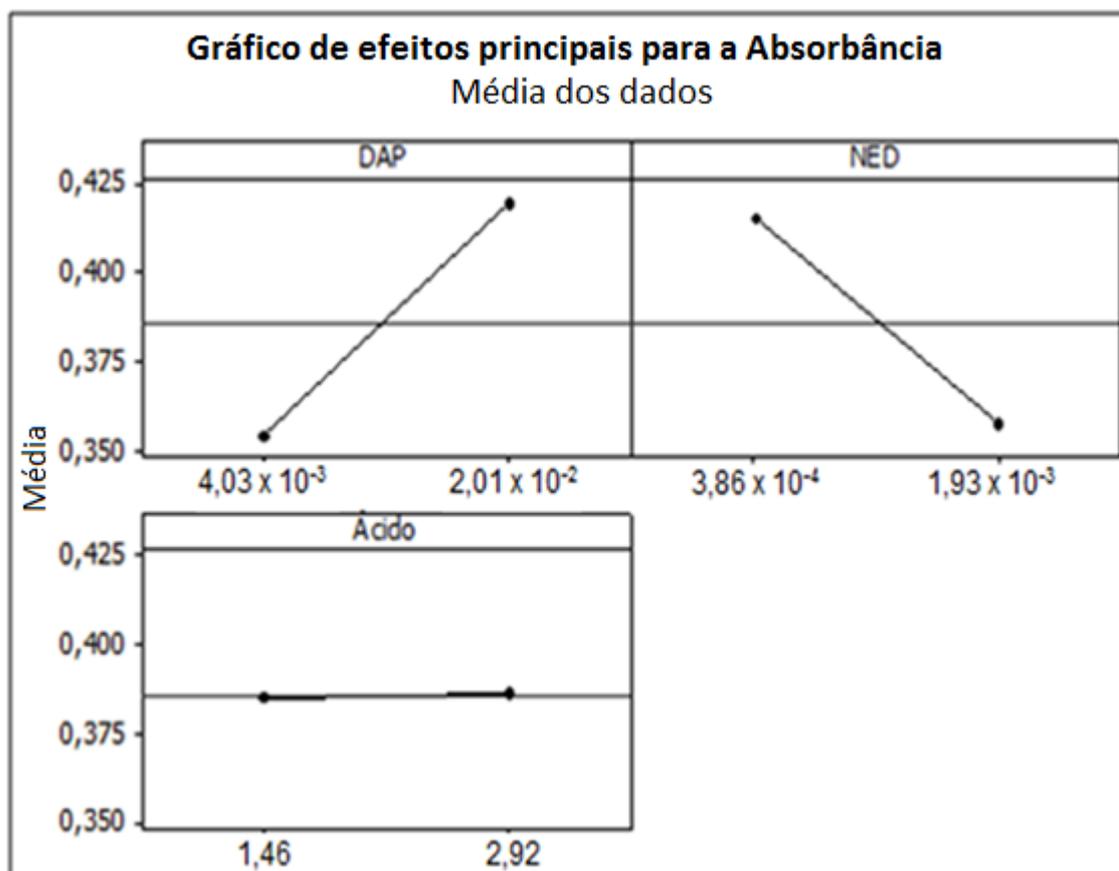
de ácido fosfórico e cada grupo diazônio formado pode então reagir com uma molécula de NED produzindo um produto colorido de cor púrpura [18].

O acompanhamento cinético da estabilidade do produto colorido mostrou que o mesmo é completamente formado após 10 minutos de reação e permanece com valores constantes de absorvância por pelo menos 60 minutos, tempo suficiente para a realização das medidas.

### Otimização das Variáveis

Para a obtenção de uma melhor resposta analítica do sistema proposto, a triagem das variáveis envolvidas na reação foi feita a partir de um planejamento  $2^3$  (fatorial completo) e em seguida um planejamento composto central [22].

Na triagem dos reagentes DAP, NED e Ácido Fosfórico, feita pelo planejamento fatorial completo, as concentrações utilizadas como mínimo e máximo foram:  $4,03 \times 10^{-3}$  e  $2,01 \times 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> para a DAP,  $3,86 \times 10^{-4}$  e  $1,93 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> para o NED e 1,46 e 2,92 mol.L<sup>-1</sup> para o Ácido Fosfórico. Nessa etapa foi verificada que a reação independe da concentração de ácido fosfórico (Fig. I). Assim, foi fixada a concentração de ácido fosfórico em 1,46 mol.L<sup>-1</sup> uma vez que não houveram variações de absorvância nas concentrações de ácido analisadas, diferente do observado nos outros reagentes (DAP e NED).



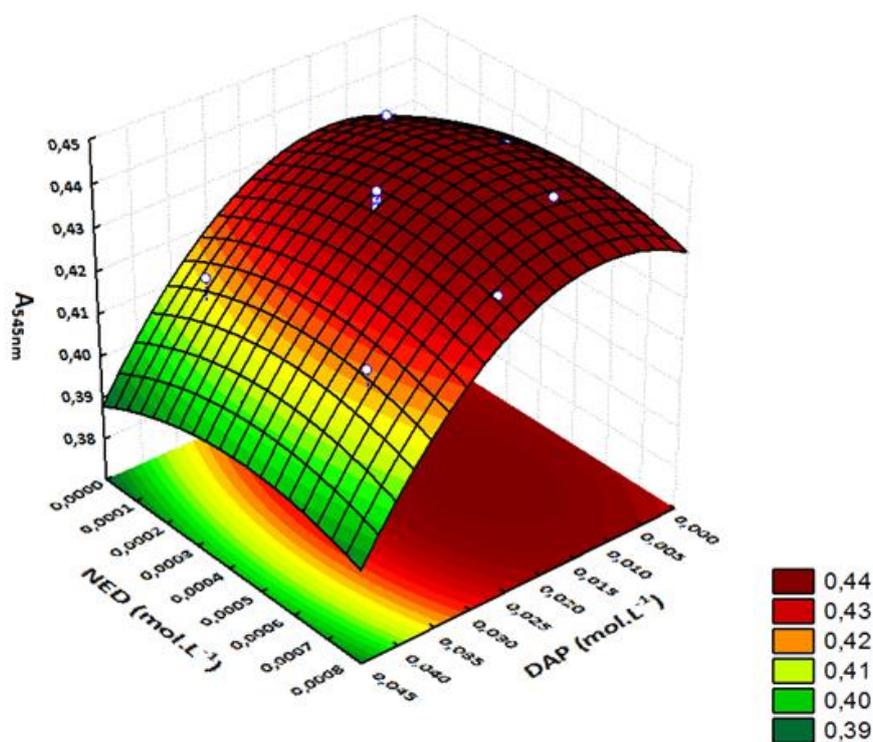
**Fig. I.** Gráfico de Efeitos Principais referente às variáveis DAP ( $4,03 \times 10^{-3}$  e  $2,01 \times 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>), NED ( $3,86 \times 10^{-4}$  e  $1,93 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>) e Ácido fosfórico (1,46 e 2,92 mol.L<sup>-1</sup>).

Após a identificação dos parâmetros mais significativos, as variáveis foram otimizadas usando o Planejamento Composto Central de modo a se obter as melhores condições analíticas para a reação. Todos os

experimentos foram realizados com a concentração de nitrito fixada em (0,40 mg.L<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 1 e na Fig. II, que ilustra a superfície de resposta obtida dos dados experimentais.

**Tabela 1** – Matriz obtida a partir das coordenadas dos pontos de planejamento composto central.

Corrida	Variáveis não codificadas		Variáveis codificadas	
	[DAP] (mol L <sup>-1</sup> )	[NED] (mol L <sup>-1</sup> )	[DAP] (mol L <sup>-1</sup> )	[NED] (mol L <sup>-1</sup> )
1	4,03 x 10 <sup>-3</sup>	4,24 x 10 <sup>-4</sup>	-√2	0
2	2,22 x 10 <sup>-2</sup>	4,24 x 10 <sup>-4</sup>	0	0
3	2,22 x 10 <sup>-2</sup>	4,24 x 10 <sup>-4</sup>	0	0
4	9,34 x 10 <sup>-3</sup>	1,79 x 10 <sup>-4</sup>	-1	-1
5	3,50 x 10 <sup>-2</sup>	1,79 x 10 <sup>-4</sup>	1	-1
6	3,50 x 10 <sup>-2</sup>	6,70 x 10 <sup>-4</sup>	1	1
7	2,22 x 10 <sup>-2</sup>	4,24 x 10 <sup>-4</sup>	0	0
8	2,22 x 10 <sup>-2</sup>	7,72 x 10 <sup>-4</sup>	0	-√2
9	2,22 x 10 <sup>-2</sup>	4,24 x 10 <sup>-4</sup>	0	0
10	2,22 x 10 <sup>-2</sup>	7,72 x 10 <sup>-5</sup>	0	-√2
11	9,34 x 10 <sup>-3</sup>	6,70 x 10 <sup>-4</sup>	-1	1
12	4,03 x 10 <sup>-2</sup>	4,24 x 10 <sup>-4</sup>	-√2	0
13	2,22 x 10 <sup>-2</sup>	4,24 x 10 <sup>-4</sup>	0	0



**Figura 2.** Superfície de resposta otimizada para a medida de absorvância em 545 nm em função das variáveis DAP (mol L<sup>-1</sup>) e NED (mol L<sup>-1</sup>).

O modelo da regressão quadrática é dado pela equação (1):

$$Z = 0,392 + 1,107X - 6,823X^2 + 12,629Y - 7044,136Y^2 - 5,568XY \quad (1)$$

Onde:

Z: fator de resposta correspondente ao valor de Absorbância

X: concentração de DAP (mol.L<sup>-1</sup>)

Y: concentração de NED (mol.L<sup>-1</sup>)

Analisando a superfície de resposta chega-se à conclusão que as melhores condições foram obtidas com [DAP] = 3,26 x 10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup> e [NED] = 3,40 x 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>.

#### *Curva Analítica e Limites de Detecção e Quantificação*

A curva analítica foi construída através de diluições apropriadas de uma solução estoque de nitrito no intervalo de (5,0 x 10<sup>-3</sup> mg.L<sup>-1</sup> – 0,5 mg.L<sup>-1</sup>) e uma relação linear foi observada entre a Absorbância (A) e a concentração de nitrito [NO<sub>2</sub><sup>-</sup>] (mg.L<sup>-1</sup>). A curva analítica é representada pela equação (2) e tem coeficiente de correlação R = 0,9999.

$$A = 0,00162 + 1,10056 x [NO_2^-] \quad (2)$$

**Tabela 2** – Determinação de nitrito em amostras de salsichas expressa em mg(NaNO<sub>2</sub>)/kg de salsicha

Amostra	Método Oficial <sup>a</sup>	Método Proposto <sup>a</sup>	Teste t <sup>b</sup> (4,30)
A	23,251±0,004	24,083±0,003	3,84
B	16,320±0,002	16,024±0,005	2,00
C	38,371±0,001	37,864±0,002	2,63

<sup>a</sup>: Média± desvio padrão (n=3); <sup>b</sup>: Valores críticos de t ao nível de confiança de 95%

Para todas as amostras de salsichas analisadas os resultados obtidos pelo método oficial e pelo método proposto foram comparados aplicando-se o teste *t* a um nível de confiança de 95%. Em todos os casos os valores obtidos mostraram-se concordantes uma vez que os valores de *t* calculados não excederam os

Onde:

A: fator de resposta correspondente ao valor de Absorbância

[NO<sub>2</sub><sup>-</sup>]: concentração de nitrito (mg.L<sup>-1</sup>)

Os valores de Limite de Detecção e de Quantificação para o nitrito foram determinados segundo recomendação da IUPAC [23] e os valores encontrados foram, respectivamente, 0,99 x 10<sup>-3</sup> mg.L<sup>-1</sup> e 3,31 x 10<sup>-3</sup> mg.L<sup>-1</sup>.

#### *Estudo de Interferentes*

Os resultados obtidos não excederam ± 5,0% no valor do sinal analítico obtido indicando que não há interferência dos íons ou compostos estudados nas condições experimentais estudadas. Portanto, o método apresentado possui uma boa seletividade e pode ser aplicado para a análise de nitrito em salsichas.

#### *Análise das amostras*

O método proposto e o oficial foram aplicados para as três amostras de salsichas, sendo os resultados apresentados na Tabela 2.

valores tabelados, indicando que o método proposto apresenta boa precisão e exatidão.

As recuperações variaram de 99,0% a 113% indicando que a composição das salsichas analisadas (Tabela 3) não interfere significativamente na análise de nitrito nas amostras.

**Tabela 3** – Adição padrão e recuperação para o Método Proposto

Amostra	Nitrito Adicionado (mg.L <sup>-1</sup> )	Nitrito Encontrado (mg.L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
A	0,050	0,052	104,0
	0,100	0,110	110,0
			$\mu^a = 107,0 \pm 4,2$
B	0,050	0,052	104,0
	0,100	0,113	113,0
			$\mu^a = 108,5 \pm 7,1$
C	0,050	0,054	108,0
	0,100	0,099	99,0
			$\mu^a = 103,5 \pm 6,4$

$\mu^a$  = Média  $\pm$  desvio padrão, n = 3.

## CONCLUSÕES

O método proposto é rápido, simples, exato, sensível e seletivo. A sulfanilamida foi substituída com sucesso por dapsona e o método desenvolvido apresentou maior sensibilidade. Adicionalmente, a quantidade de resíduo gerada é muito menor do que o método espectrofotométrico oficial, podendo ser considerado como um método ambientalmente mais limpo.

Os resultados obtidos pelo método proposto mostraram ser concordantes com aqueles obtidos pelo método oficial. As amostras de salsichas analisadas

apresentaram quantidade de nitrito de sódio entre 16 e 38 mg de NaNO<sub>2</sub>/Kg de salsicha, estando de acordo com a legislação brasileira que estabelece limite máximo permitido de 150 mg de NaNO<sub>2</sub>/Kg de salsicha.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e MCT/CNPq/MAPA/SDA (Proc. 578216/2008-6).

## REFERÊNCIAS

- [1] Ramos, L. A., Cavalheiro, C. S. and Cavalheiro, E. T. G., *Quim. Nova.* 29 (5) (2006) 1114.
- [2] Oga, S., *Fundamentos de Toxicologia.* Atheneu, São Paulo, 1996.
- [3] Pourreza, N., Fat'hi, M. R. and Hatami, A. *Microchem. J.* 104 (2012) 22.
- [4] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Portaria nº 1004, 11 de dezembro de 1998. Dispõe regulamento técnico: Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – carne e produtos cárneos. *Diário Oficial da União, Brasília,* 22 mar. 1999.
- [5] Abbas, M. N. and Mostafa, G. A., *Anal. Chim. Acta.* 410 (2000) 185.
- [6] Al-Okab, R. A. and Syed, A. A., *Talanta.* 72 (2007) 1239.
- [7] Tsikas, D. J., *Chromatogr., B.* 851 (2007) 51.
- [8] AOAC International; *Official Methods Of Analysis Of AOAC International, Association of Official Analytical Chemists: Arlington,* 16<sup>a</sup> Ed., 1995.
- [9] Melchert, W. R., Infante, C. M. C. and Rocha, F. R. P., *Microchem. J.* 85 (2007) 209.
- [10] Burakham, R., Oshima, M., Gudpan, K. and Motomizu, S., *Talanta.* 64 (5) (2004) 1259.

- [11] Baeza, M., Bartroli, J. and Alonso, J., *Talanta*. 68 (2) (2005) 245.
- [12] Pourhossein, M., Amini, M. K. and Talebi, M., *Anal. Sci.* 21 (6) (2005) 661.
- [13] Kanda, Y. and Taira, M., *Anal. Sci.* 19 (5) (2003) 695.
- [14] Liu, P. and Hu, J. J., *Electroanal. Chem.* 566 (2004) 423.
- [15] Biagiotti, V., Valentini, F., Tamburri, E., Terranova, M. L., Moscone, D. and Palleschi, G., *Sens. Actuators B*. 122 (1) (2007) 236.
- [16] Noroozifar, M., Khorasani-Motlagh, M., Taheri, A. and Homayoonfard, M., *Talanta*. 71(1) (2007) 359.
- [17] Fernandez-Arguelles, M. T., Canabate, B., Costa-Fernandez, J. M., Pereiro, R. and Sanz-Medel, A., *Talanta*. 62 (5) (2004) 991.
- [18] Luiz, V. H. M., Pezza, L. and Pezza, H. R., *Food Chem.* 134 (4) (2012) 2546.
- [19] Bhakta, S. A., Borba, R., Taba, J. R. M., Garcia, C. D. and Carrilho, E., *Analytica Chimica Acta*. 809 (2014) 117.
- [20] Costa, E. O., *Rev. Higiene Alimentar.* 10 (44) (1996) 15.
- [21] Anastas, P. T., *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 167.
- [22] Barros Neto, B., Scarminio, I. S. and Bruns, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na Indústria*, Editora da Unicamp, Campinas, 3ed., 2007.
- [23] Thompson, M., Ellison, S. L. R. and Wood, R., *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 835.