

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS  
PARA EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE  
NITROSAMINAS EM ALIMENTOS**

**Pedro José Sanches Filho**

MSc em Química

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFRGS  
como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.*

**PORTO ALEGRE**

**Novembro 2002**

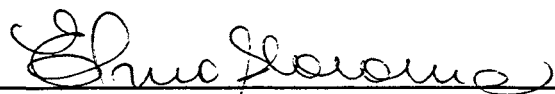
**INSTITUTO DE QUÍMICA/UFRGS  
BIBLIOTECA**

## DECLARAÇÃO DE AUTORIA

Este trabalho foi orientado pela Prof<sup>a</sup> Dra. Elina Bastos Caramão e desenvolvido no Laboratório de Pesquisa E-202 e Central Analítica, do Instituto de Química da UFRGS. Parte dos experimentos que tiveram início em Abril de 1999 foram realizados neste Instituto, sob a supervisão da professora orientadora.

No período de Julho de 2000 a Junho de 2001, a parte experimental, referente aos estudos sobre Eletroforese Capilar, foi desenvolvida na Espanha, no Departamento de Química Analítica e Ecologia, da Universidade de Córdoba, sob a supervisão do Prof Dr. Miguel Valcárcel.

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química e aprovada em sua forma final, pela Orientadora e pela Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Química.

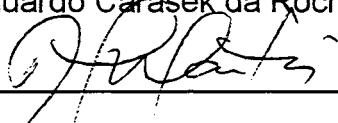


Orientadora: Profa. Dra. Eline Bastos Caramão

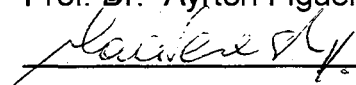
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha - UFSC



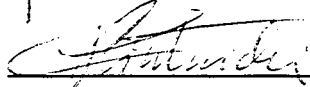
Prof. Dr. Ayrton Figueiredo Martins - UFSM



Profa. Dra. Maria Tereza Raya Rodrigues - UFRGS



Profa. Dra. Maria Goreti Rodrigues Vale - UFRGS



Profa. Dra. Clarisse Maria Sartori Piatnicki - UFRGS

---

Prof. Dr. Jairton Dupont

Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química

## AGRADECIMENTOS

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica do Rio Grande do Sul (CEFET RS) em especial aos colegas da Coordenadoria de Química pela liberação de minhas atividades de docência para que o desenvolvimento deste trabalho fosse possível.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por fornecer suporte institucional e as instalações para trabalho experimental.

À Dra. Elina Bastos Caramão pelo seu comprometimento profissional, amizade, apoio e orientação deste trabalho.

Ao Grupo de Química Analítica e Ecologia da Universidade de Córdoba (Espanha), bem como aos Doutores Miguel Valcárcel, Angel Rios e Lurdes Arce pela orientação e suporte institucional referente aos trabalhos desenvolvidos na área de Eletroforese capilar e extração com Fluido supercrítico.

Às alunas de iniciação científica, Kelen Zanin, e de aperfeiçoamento Débora Figueiredo Gay, por toda ajuda durante a execução deste trabalho.

A Ronaldo Garcia pelo incentivo e participação na execução dos trabalhos nos laboratórios da Universidade de Córdoba.

Aos colegas do Grupo de Química Ambiental pela convivência salutar e agradável neste período, em especial à Prof Dra Regina Rodrigues pelo companheirismo e amizade no período em que estivemos trabalhando junto à Universidade de Córdoba.

À CAPES (Brasil) e ao DG/MCT (Espanha) pelo suporte financeiro.

Aos meus pais, Pedro e Helen, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para concretização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	página
<b>AGRADECIMENTOS</b>	iii
<b>SUMÁRIO</b>	iv
<b>LISTA DE TABELAS</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	xiii
<b>RESUMO</b>	xiv
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 – REVISÃO DA LITERATURA</b>	5
2.1 Nitrosaminas: Definição Propriedades e Origem	5
2.2 Nitrosaminas: Toxicidade	9
2.3 Análise de Nitrosaminas	13
2.4 Extração e Preparo de Amostras para Análise de Nitrosaminas	15
2.4.1 Extração com Fluido Supercrítico – SFE	18
2.5 Isolamento e Pré-Concentração de Nitrosaminas a Partir de Extratos Aquosos	19
2.5.1 Extração em Fase Sólida – SPE	20
2.5.1.1 Configuração do Processo de Adsorção	22
2.5.1.2 Alguns Adsorventes Utilizados na SPE	23
2.5.1.2.1 Carvão Ativo	23
2.5.1.2.2 Resinas tipo Amberlyst XAD	26
2.5.2 Microextração em Fase Sólida – SPME	27
2.5.3 Extração Líquido-Líquido – LLE	28
2.6 Técnicas de Análise	28
2.6.1 Discussão dos Métodos de Detecção por Espectrometria de Massas	31
2.6.1.1 Espectrometria de Massas de Baixa Resolução	31
2.6.1.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução	34
2.6.2 Eletroforese Capilar	34
2.6.2.1 Introdução	34
2.6.2.1.1 Eletromigração	37
2.6.2.1.2 Eletroosmose	38
2.6.2.2 Tipos de Eletroforese	41
2.6.2.2.1 Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar (MEKC)	42
2.6.2.2.1.1 Micelas	43
2.6.2.2.3 Condições de Operação a Serem Otimizadas	45
2.6.2.3.1 O Capilar	45
2.6.2.3.2 Voltagem Aplicada	46
2.6.2.3.3 Temperatura	46
2.6.2.3.4 O Eletrólito Suporte – Solução Tampão	47
2.6.2.3.5 pH	47
2.6.2.3.6 Adição de Solventes Orgânicos	47
2.6.2.3.7 Agentes de Interação – Ciclodextrinas (CD)	48
2.6.2.3.8 Injeção	48
2.6.2.4 Eletroforese Capilar na Análise de Nitrosaminas	49

	página
2.7. Proposta de Trabalho	50
<b>3 – PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>52</b>
3.1 Reagentes	52
3.1.1 Adsorventes	52
3.1.1.1 Carvão ativo (CA)	53
3.1.1.2 Resina XAD-4	53
3.1.2 Padrões	54
3.2 Equipamentos	54
3.2.1 Extração	54
3.2.2 Análise por CROMATOGRAFIA GASOSA	54
3.2.2.1 Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (GC-FID)	54
3.2.2.1 Cromatografia Gasosa com Detector de Espectrometria de Massas (GC-MSD)	55
3.2.3 Análise por MEKC	56
3.3 Amostras	56
3.3.1 Amostras Sintéticas	56
3.3.2 Amostras Reais	56
3.4 Otimização das Condições para Análise Cromatográfica dos Extratos	57
3.5 Desenvolvimento do Método MEKC	58
3.5.1 Preparo e Condicionamento do Capilar	58
3.5.2 Otimização das Variáveis Químicas	59
3.5.2.1 O Tampão	59
3.5.2.2 Variáveis Estudadas	59
3.5.3 Otimização das Variáveis Instrumentais	60
3.5.4 Caracterização do Método MEKC	61
3.5.5 Análise Qualitativa por MEKC	61
3.6 Extração das Nitrosaminas a Partir de Amostras Reais	62
3.7 Extração, Pré-Concentração e <i>clean up</i> das Nitrosaminas a Partir de Amostras Aquosas	62
3.7.1 Extração Líquido-Líquido	62
3.7.2 SPE usando Resina Amberlyst XAD-4™	63
3.7.2.1.1 Análise do Líquido de Conserva Bruto e Destilado (Amostra A)	64
3.7.3 SPE Usando Carvão ativo	64
3.7.3.1 Processo de SPE em Batelada com Carvão Ativo em Pó	64
3.7.3.1.1 Avaliação por Cromatografia Gasosa	64
3.7.3.1.2 Avaliação por MEKC	67
3.7.3.1.2.1 Caracterização do Método Eletroforético Usando SPE com Carvão Ativo em Pó	68
3.7.3.2 Processo de SPE em Coluna com Carvão Ativo Granular	68
3.7.3.2.1 Avaliação por MEKC	69
3.7.3.2.1.1 Caracterização do Método Eletroforético Usando SPE com Carvão Ativo Granular	69
3.7.3.2.2 Avaliação por Cromatografia Gasosa	70
3.7.3.2.2.1 Caracterização do Método GC-FID Usando SPE com Carvão Granular	70
3.7.3.5 Aplicação do Procedimento Desenvolvido a Amostras Reais	71
3.7.3.5.1 Análise das Amostras Líquidas	71
3.7.3.5.2 Análise das Amostras Sólidas	72
3.7.3.5.3 Análise Qualitativa	72
3.7.3.5.4 Análise Quantitativa	72

	página
<b>4 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b>	<b>74</b>
4.1 Análise Instrumental de Nitrosaminas: GC e MEKC	74
4.1.1 Análise por Cromatografia Gasosa: Otimização das Condições de Análise	74
4.1.1.1 Linearidade e Limite de Detecção para o Sistema GC/FID	76
4.1.1.2 Linearidade e Limite de Detecção para o Sistema GC/MSD	77
4.1.2 Análise por Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar: Otimização das Condições de Análise	79
4.1.2.1 Otimização das Variáveis Químicas	80
4.1.2.1.1 pH	81
4.1.2.1.2 $\gamma$ Ciclodextrina (CD)	82
4.1.2.1.3 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	83
4.1.2.1 Variáveis Instrumentais	84
4.1.2.1.1 Comprimento de Onda para Detecção	85
4.1.2.1.2 Modo de Injeção	85
4.1.2.1.3 Voltagem de Separação	87
4.1.2.3 Identificação dos Compostos	90
4.1.2.4 Caracterização do Método Eletroforético	93
4.2 Extração de Nitrosaminas a Partir de Matrizes Aquosas (Pré-Concentração e <i>clean up</i> )	93
4.2.1 Extração Líquido-Líquido	93
4.2.2 Extração em Fase Sólida com Amberlyst XAD-4 <sup>™</sup>	94
4.2.2.1 Aplicação da Extração em Fase Sólida com Amberlyst XAD-4 <sup>™</sup> a Amostras Reais	97
4.2.3 Extração em Fase Sólida com Carvão Ativo	97
4.2.3.1 Desenvolvimento da Metodologia de SPE com Carvão Ativo em Pó	97
4.2.3.1.1 Determinação do Tempo de Adsorção/Extração	99
4.2.3.1.2 Influência da Quantidade de Adsorvente	100
4.2.3.1.3 Estudos de Recuperação a Partir do Carvão Ativo em Pó	101
4.3 Comparação das Três Técnicas de Extração	102
4.4 Aplicação do Carvão Ativo na Pré-Concentração de Nitrosaminas para Análise por MEKC	104
4.4.1 Estudo do Carvão Ativo em Pó	104
4.4.1.1 Estudo da Massa do Carvão Ativo em Pó	104
4.4.1.2 Estudo do Tempo de Agitação	106
4.4.1.3 Estudo em Baixas Concentrações – 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	107
4.4.1.4 Caracterização do Método de SPE/MEKC	108
4.4.1.5 Aplicação a Amostras Sintéticas Aquosas	109
4.4.1.6 Aplicação a Amostras Reais	111
4.4.1.6.1 Líquido de Conserva Bruto	111
4.4.1.6.2 Líquido de Conserva Destilado	113
4.4.1.6.3 Massa da Salsicha	114
4.4.2 Estudo do Carvão Ativo Granular	117
4.4.2.1 Otimização do Procedimento de SPE em Leito Fixo	117
4.4.2.2 Estudo das Recuperações e Saturação da Fase para Carvão Ativo Granular	118
4.4.2.3 Caracterização do Método SPE com Carvão Ativo Granular e Análise por MEKC	120
4.5 Análise de Amostras Reais por SPE com Carvão Ativo em Pó por Cromatografia Gasosa	122
4.5.1 Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama	122
4.5.2 Cromatografia Gasosa com Detector de Espectrometria de Massas	123
4.5.2.1 Análise Qualitativa	123

	página
4.5.2.1.1 Análise do Líquido de Conserva da Amostra A	123
4.5.2.2 Análise Quantitativa das Amostras	125
4.5.2.2 Análise Quantitativa das Amostras FORTIFICADAS	126
4.6 Análise de Amostras Reais por SPE com Carvão Ativo Granular por Cromatografia Gasosa	128
4.6.1 Caracterização do Método por SPE/GC/FID com Carvão Ativo Granular	128
4.6.1.2 Aplicação da Metodologia SPE/GC/FID à Mistura Sintética Aquosa com Carvão Ativo Granular – Cálculo da Exatidão do Processo	131
4.6.1.3 Aplicação da metodologia SPE com Carvão Ativo Granular e GC/FID a Amostras Reais	132
4.6.2 Análise de Amostras Reais por SPE/GC/MSD com Carvão Ativo Granular	134
4.6.2.1 Destilado da Massa de Salsicha da Amostra A	134
4.6.2.2 Líquido de Conserva Destilado - Amostra A	136
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>139</b>
5.1 Quanto Às metodologias para extração e pré-concentração	139
5.2 Quanto ao Procedimento de Análise	140
5.3 Quanto Às amostras estudadas	141
<b>6. BILIOGRAFIA</b>	<b>143</b>
<b>7. PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>151</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>153</b>
<b>ANEXO I:</b> Determinação da linearidade para o sistema GC/FID na análise cromatográfica das nitrosaminas	154
<b>ANEXO II:</b> Determinação da linearidade para o sistema GC/MSD na análise cromatográfica das nitrosaminas	156
<b>ANEXO III:</b> Estudo de nitrosaminas por absorção molecular no UV-vis	158
<b>ANEXO IV:</b> Produção científica gerada no período	163
<b>ANEXO V:</b> cópia dos artigos publicados no período	167



## LISTA DE TABELAS

	página	
Tabela I:	Propriedades espectrais características de N-Nitrosaminas	7
Tabela II:	Ocorrência de Nitrosaminas	9
Tabela III:	Atividade carcinogênica de algumas Nitrosaminas	12
Tabela IV:	Toxicidade aguda para algumas nitrosaminas	12
Tabela V:	Resumo de alguns métodos utilizados na análise de Nitrosaminas	14
Tabela VI:	Recuperações descritas pelo método da EPA 7080A para amostras aquosas	17
Tabela VII:	Fases comuns usadas em SPE	24
Tabela VIII:	Capacidade adsorviva do carvão ativo para alguns analitos	26
Tabela IX:	Concentração Micelar Crítica para alguns dos surfactantes mais usados	44
Tabela X:	Nitrosaminas usadas como padrões neste trabalho	55
Tabela XI:	Condições cromatográficas aplicadas aos extratos analisados	58
Tabela XII:	Comparação entre condições de trabalho para otimização do método eletroforético	60
Tabela XIII:	Composição dos tampões estudados.	60
Tabela XIV:	Identificação dos compostos assinalados na Figura 22 e dos íons utilizados no monitoramento via GC/MSD	76
Tabela XV:	Parâmetros de caracterização do método GC/FID	76
Tabela XVI:	Principais parâmetros relativos ao método GC/MSD	78
Tabela XVII:	Tempos de migração e correntes geradas para diferentes tampões	81
Tabela XVIII:	Composição das amostras sintéticas usadas na identificação dos picos nos eletroferogramas	90
Tabela XIX:	Parâmetros de caracterização do método eletroforético	92
Tabela XX:	Valores de concentração encontrados para diferentes amostras aquosas sintéticas analisadas por MEKC nas condições otimizadas	93
Tabela XXI:	Valores de área relativa dos picos cromatográficos, desvio padrão percentual e recuperação para os extratos obtidos por LLE de soluções padrão aquosas de nitrosaminas nas concentrações de 400, 800 e 1200 µg L <sup>-1</sup>	94
Tabela XXII:	Valores de área relativa dos picos cromatográficos, desvio padrão percentual e recuperação para os extratos obtidos por SPE com XAD-4 de soluções padrão aquosas de nitrosaminas nas concentrações de 400, 800 e 1200 µg L <sup>-1</sup>	95
Tabela XXIII:	Influência do tempo de extração/agitação sobre a recuperação dos compostos por SPE com carvão ativo em pó (0,5 g), a partir de 25 mL de uma solução padrão aquosa a 800 µg L <sup>-1</sup>	100
Tabela XXIV:	Influência da quantidade de fase estacionária na área relativa dos picos cromatográficos para 25 mL de solução padrão a 800 µg L <sup>-1</sup> submetida a SPE por 15 minutos	101
Tabela XXV:	Estudos de recuperação para processo em batelada com carvão ativo em pó (GC/FID)	103
Tabela XXVI:	Variação na recuperação para o processo de SPE com CA em pó, avaliado por MEKC, usando diferentes concentrações e diferentes massas de adsorvente	105
Tabela XXVII:	Distribuição dos compostos nos eluatos e na água residual no processo de pré-concentração a partir de 1 g de CA em pó, 25 mL de uma solução padrão a de 800 µg L <sup>-1</sup> e 45 min de agitação	106
Tabela XXVIII:	Variação na recuperação para o processo de SPE com CA em pó, avaliado por MEKC, usando diferentes tempos de agitação	109
Tabela XXIX:	Variação na recuperação para o processo de SPE com CA em pó, avaliado por MEKC, usando diferentes tempos de agitação e diferentes massas de adsorvente*	108
Tabela XXX:	Caracterização do método SPE/MEKC na faixa de 50 a 500 µg L <sup>-1</sup> , usando um volume de amostra 100 mL	108
Tabela XXXI:	Caracterização do método SPE/MEKC na faixa de 50 a 500 µg L <sup>-1</sup> , usando um volume de amostra 200 mL	109

	Página
Tabela XXXII: Aplicação da técnica de SPE associada a MEKC para a análise de amostras sintéticas nas condições definidas no item 4.4.1.3	110
Tabela XXXIII: Valores de recuperação obtidos para os compostos a partir de 150 g do destilado do líquido de conserva da amostra B	114
Tabela XXXIV: Valores de recuperação obtidos para os compostos a partir de 150 g do destilado da massa da salsicha Amostra B	115
Tabela XXXV: Resultados obtidos para a análise quantitativa da massa de salsicha da amostra A, usando SPE com CA em pó e GC/MSD	117
Tabela XXXVI: Estudo das recuperações para SPE com CA granular analisado por MEKC, usando três diferentes concentrações da amostra sintética aquosa	120
Tabela XXXVII: Caracterização do método de SPE com CA Granular e análise por MEKC, usando 200 mL de amostra sintética aquosa	121
Tabela XXXVIII: Estudo do erro percentual para a análise de uma amostra aquosa sintética analisada por MEKC nas condições otimizadas da SPE com CA granular	121
Tabela XXXIX: Análise qualitativa e quantitativa do eluato com acetona da amostra A obtido por SPE com CA em pó e GC/FID	122
Tabela XL: Resultados obtidos para a análise quantitativa da amostra A usando SPE com CA em pó e GC/MSD	126
Tabela XLI: Características e curvas de calibração para o método de SPE/GC/FID usando 1 g de carvão ativo granular e 200 mL de solução aquosa na concentração de 10 µg L <sup>-1</sup> a 200 µg L <sup>-1</sup>	130
Tabela XLII: Estudo da exatidão do processo de SPE usando carvão granular e GC/FID	132
Tabela XLIII: Análise quantitativa do extrato do destilado por arraste de vapor a vácuo da massa de salsicha da amostra A, obtido por SPE com carvão ativo granular e GC/FID	133
Tabela XLIV: Análise quantitativa do extrato do destilado por arraste de vapor a vácuo da massa de salsicha da amostra A, obtido por SPE com carvão ativo granular e GC/MSD	134
Tabela XLV: Resultados da análise quantitativa do eluato de acetona do líquido de conserva destilado da amostra A obtido por SPE com carvão ativo granular e analisado por GC/MSD	137

## LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1: Fórmulas estruturais das (a) Nitrosaminas; (b) Nitrosamidas	6
Figura 2: Deslocalização dos elétrons $\pi$ do grupo funcional NNO	6
Figura 3: Mecanismo e equação geral para síntese de nitrosaminas	7
Figura 4: Oxidação do ácido ascórbico pelo agente nitrosante	8
Figura 5: Ativação metabólica das nitrosaminas com liberação do carbocátion alquilante	10
Figura 6: Procedimentos comuns para a extração de Nitrosaminas	17
Figura 7: Esquema genérico para a adsorção dos analitos por SPE	23
Figura 8: Representação da superfície do carvão ativo e da resina XAD-4	25
Figura 9: Esquema completo da reação de Griess	29
Figura 10: Reação de geração de Quimiluminescência no TEA	30
Figura 11: Esquema geral da fragmentação da <i>o</i> -n-propilnitrosamina	32
Figura 12: Espectros de massas de algumas nitrosaminas de reconhecida importância ambiental	33
Figura 13: Esquema geral do equipamento de eletroforese capilar	36
Figura 14: Mecanismo de ionização dos grupos silanóis	39
Figura 15: Esquema geral da geração do fluxo eletroosmótico no interior do capilar de sílica	39
Figura 16: Esquema simplificado do fluxo laminar(a) e do fluxo parabólico (b)	41
Figura 17: Esquema geral do processo de separação por cromatografia capilar eletrocínética micelar	42
Figura 18: Tipos de injeção em eletroforese capilar (A) Injeção Eletrocínética, (B) Injeção por Pressão e (C) Injeção por Sifonagem.	49
Figura 19: Representação pictórica da pré-concentração das nitrosaminas usando SPE com resina XAD-4 <sup>TM</sup>	64
Figura 20: Esquema geral usado para o desenvolvimento da metodologia de SPE com carvão ativo	66
Figura 21: Representação pictórica da pré-concentração das nitrosaminas usando SPE com carvão ativo	66
Figura 22: Cromatogramas da mistura padrão (a) GC/FID com coluna HP-5, (b) GC/MSD com coluna HP-1 e (c) GC/MSD com coluna Carbowax 20M	75
Figura 23: Cromatogramas (GC/FID com coluna HP-5) para a mistura de padrões nas concentrações de 5 e 10 mg L <sup>-1</sup>	77
Figura 24: Cromatogramas do Íon Total (GC/MSD com Coluna Carbowax 20M) para a mistura de padrões nas concentrações de 0,25 e 0,10 mg L <sup>-1</sup>	79
Figura 25: Eletroferograma para mistura padrão na concentração de 20 mg L <sup>-1</sup>	80
Figura 26: Eletroferograma da mistura padrão a 20 mg L <sup>-1</sup> em pH 4,0	82
Figura 27: Comparação entre eletroferogramas obtidos a partir de uma mistura padrão 20 mg L <sup>-1</sup> com e sem adição de CD	83
Figura 28: Eletroferogramas da mistura padrão com diferentes valores de concentração de SDS (A) 80 mMol L <sup>-1</sup> (tampão 5); (B) 40 mMol L <sup>-1</sup> (tampão 3)	84
Figura 29: Variação da área do pico no eletroferograma com o comprimento de onda para mistura sintética na concentração de 2,0 mg L <sup>-1</sup>	85
Figura 30: Comparação entre os eletroferogramas obtidos com diferentes métodos de injeção: (A) eletrocínética com 10 kV por 10 s e (B) hidrodinâmica por 10 s	86
Figura 31: Comparação entre as áreas dos picos obtidos no eletroferograma em diferentes voltagens de injeção eletrocínética	86
Figura 32: Variação das áreas dos picos obtidos no eletroferograma em diferentes tempos de injeção eletrocínética	87
Figura 33: Estudo da variação do tempo de migração com a voltagem de separação	88
Figura 34: Variação da área dos picos obtidos no eletroferograma com a voltagem de separação	89
Figura 35: Eletroferograma da mistura padrão a 2 mg L <sup>-1</sup> após otimização das condições	89
Figura 36: Comparação entre os eletroferogramas para as diferentes amostras sintéticas e um branco	91

	página
Figura 37: Comparação entre as áreas relativas dos picos cromatográficos dos compostos no extrato de SPE, na água residual e na solução padrão não submetida ao processo de extração, para três concentrações (400, 800 e 1200 $\mu\text{g L}^{-1}$ )	96
Figura 38: Cromatograma pelo monitoramento de íons (GC/MSD – modo SIM) do extrato obtido via SPE-XAD-4 do destilado da amostra A	98
Figura 39: Cromatogramas do íon total (GC/MSD) dos eluatos com acetona e com diclorometano, a partir da análise de branco (água bidestilada) por SPE com carvão ativo em pó	99
Figura 40: Variação das recuperações para 25 mL da amostra (800 $\mu\text{g L}^{-1}$ ) extraídas com as três técnicas estudadas (LLE, SPE-XAD-4 e SPE com carvão ativo)	103
Figura 41: Variação das áreas relativas do composto NPIP para destilados obtidos de 150 g da amostra A extraída por arraste de vapor e pré-concentrada usando as três técnicas estudadas (LLE, SPE-XAD-4 e SPE - com carvão ativo em pó)	103
Figura 42: Comparação entre as recuperações obtidas no processo de SPE com CA em pó, avaliado por MEKC, usando diferentes concentrações e diferentes massas de adsorvente	105
Figura 43: Comparação entre os eletroferogramas dos eluatos de acetona e DCM para amostra sintética 3 após a pré-concentração por SPE com carvão ativo em pó nas condições definidas no item 4.4.1.3	110
Figura 44: Comparação entre os eletroferogramas dos eluatos obtidos da SPE com carvão ativo em pó aplicada ao líquido de conserva da amostra B, sem destilar: (A) acetona; (B) DCM; (C) DCM marcado com de 5 $\text{mg L}^{-1}$ da mistura de padrões	112
Figura 45: comparação entre os espectros de UV-vis da biblioteca e do possível analito DEN detectado no líquido de conserva da amostra B	112
Figura 46: Comparação entre eletroferogramas obtidos a partir dos eluatos de acetona usando CA em pó e 150 g de líquido de conserva destilado: (A) amostra fortificada com 1 $\text{mg L}^{-1}$ (B) amostra sem marcar	113
Figura 47: Comparação entre eletroferogramas: (A) mistura padrão a 10 $\text{mg L}^{-1}$ , (B) eluato com acetona do destilado da amostra B marcado com 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ da mistura padrão de nitrosaminas, (C) eluato com acetona da amostra B marcado com 5 $\text{mg L}^{-1}$ da mistura padrão de nitrosaminas	115
Figura 48: Comparação entre eletroferogramas: (a) eluato de acetona para amostra A (b) repetição do mesmo eluato, adicionado de 5 $\text{mg L}^{-1}$ de mistura padrão	116
Figura 49: Variação das áreas dos picos no eletroferograma para os compostos de acordo com a variação no fluxo da eluição da amostra aquosa usando SPE com carvão ativo granular	117
Figura 50: Variação das áreas dos picos dos compostos no eluato de acetona, de DCM e na água residual para 200 mL de uma amostra sintética 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ , usando SPE com CA granular e MEKC	119
Figura 51: Cromatograma (GC/MSD – modo SIM) do concentrado obtido a partir da análise direta do líquido de conserva das salsichas, via SPE com CA em pó	124
Figura 52: Cromatograma (GC/MSD – modo SIM) do concentrado obtido a partir da análise do destilado obtido do líquido de conserva das salsichas, via SPE com CA em pó. Coluna HP-1 e padrão interno na concentração de 2 $\text{mg L}^{-1}$	124
Figura 53: Cromatograma (GC/MSD – modo SIM) do concentrado obtido a partir da massa das salsichas, via SPE com CA em pó	125
Figura 54: Cromatograma (GC/MSD – modo SIM) do concentrado obtido a partir do eluato de acetona de 150 g de massa das salsichas (amostra A) fortificada com 200 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ , via SPE com CA em pó	127
Figura 55: Cromatograma (GC/MSD – modo SIM) do concentrado obtido a partir do eluato de DCM de 150 g de massa das salsichas (amostra A) fortificada com 200 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ , via SPE com CA em pó	128
Figura 56: Comparação entre os cromatograma (GC/FID) da solução padrão a 10 $\text{mg L}^{-1}$ (A) e dos eluatos de acetona de soluções aquosas a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (B) e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (C) submetidas ao processo de SPE com CA granular.	129

Figura 57:	Comparação entre os cromatogramas dos eluatos de acetona obtidos por SPE com CA granular do destilado da massa de salsicha da amostra A com e sem adição de padrão, GC/FID. Coluna HP 1	página 133
Figura 58:	Cromatogramas (GC/MSD) do eluato de acetona obtido pela aplicação da SPE com CA granular do destilado da amostra A: (A) fortificada com 200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e usando coluna HP1; (B) sem marcar também usando coluna HP1; (C) Zoom da Figura 60A e (D) Zoom da amostra sem marcar analisada em coluna Carbowax 20M	135
Figura 59:	Cromatograma GC/MSD para o eluato de acetona do líquido de conserva destilado da amostra A obtido por SPE com CA granular usando Coluna Carbowax 20M	137
Figura 60:	Cromatograma GC/MSD para o eluato de acetona do líquido de conserva destilado da amostra A obtido por SPE com CA granular usando Coluna HP-1	138

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Área relativa
CA	Carvão ativo
CD	Ciclodextrina
DBN	Dibutilnitrosamina
DCM	Diclorometano
DEN	Dietilnitrosamina
DMN	Dimetilnitrosamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP%	Desvio padrão percentual
DPN	Dipropilnitrosamina
GC/FID	Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (Gas chromatography with flame ionization detector)
GC/MSD	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (Gas chromatography with mass spectrometer detector)
GC/NPD	Cromatografia gasosa com detector para Fósforo e Nitrogênio (Gas chromatography with nitrogen and phosphorus detector)
GC/TEA	Gas chromatography with Thermal energy analyser detector
HPA	Hidrocarbonetos poliaromáticos
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução (High performance liquid chromatography)
HPLC/MS	Cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrometria de massas (High performance liquid chromatography coupled to mass spectrometer detector)
LLE	Extração líquido-líquido (Liquid-liquid extraction)
m/z	Razão massa pela carga
MEKC	Cromatografia Capilar Eletrocinética Micelar do inglês <i>Micelar Electrokinetic Chromatography</i>
MEN	metiletilnitrosamina
NPIP	N-nitrosopiperidina
NPIR	N-nitrosopirrolidina
NMOR	N-Nitrosomorfolina
PI	Padrão Interno
PLC	Cromatografia líquida preparativa (Preparative liquid chromatography)
ppb	parte por bilhão
ppm	parte por milhão
REC%	Porcentagem de recuperação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFE	Extração com fluido supercrítico (Supercritical fluid extraction)
SIM	Monitoramento de íons simples (Single ion monitoring)
SPE	Extração em fase sólida (Solid phase extraction)
SPME	Microextração em fase sólida (Solid phase microextraction)
u	Unidade de massa atômica
US EPA	Environmental Protection Agency of United States
UV-vis	Ultravioleta visível
Ve	Velocidade Eletroforética
V	Volt
μe	Mobilidade eletroforética

## RESUMO

Neste trabalho desenvolveu-se uma metodologia para extração, pré-concentração e determinação de Nitrosaminas a partir de amostras de produtos cárnicos tratados com nitrito. Para isto utilizou-se a extração a vácuo com arraste de vapor para extração e captação dos analitos em fase aquosa. Para pré-concentração destes analitos a partir da fase aquosa, estudou-se SPE com diferentes adsorventes (resina Amberlyst XAD-4, carvão ativo em pó e granular). A SPE foi testada em leito fixo (em coluna) e, também em batelada, para adsorventes com menor granulometria. A extração líquido – líquido, usando diclorometano como solvente extrator, foi usada como técnica de referência para fins de comparação.

Para análise dos extratos utilizou-se a cromatografia gasosa, com detector de ionização por chama (GCFID) e com detector de espectrometria de massas (GCMSD), e a cromatografia capilar eletrocínica micelar (MEKC). As análises por GCFID e MEKC carecem de seletividade na identificação dos compostos. Isto faz com que estas metodologias analíticas sejam consideradas como viáveis para análises quantitativas de amostras com matrizes não muito complexas que já se conheçam quais compostos estão presentes.

Os melhores resultados foram obtidos pela combinação do processo de SPE com carvão ativo granular, usando o procedimento em leito fixo, analisado por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas. Este arranjo permitiu a extração e a análise de amostras de massa de salsichas enlatadas e do líquido de conserva das mesmas, com sensibilidade e seletividade necessárias para análise de nitrosaminas. Os limites de detecção ao nível de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , e abaixo de  $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$  encontram-se dentro dos padrões exigidos pelos órgãos internacionais de controle ambiental como EPA (*Environmental Agency Protection*) e FSIS *Food Safety Inspection Service*. Os principais compostos detectados nas amostras (salsichas enlatadas brasileiras e espanholas) foram Dimetilnitrosamina, Dietilnitrosamina, N-nitrososmorfolina, N-nitrososopiperidina e N-nitrosopirrolidina, sendo este último o mais abundante.

**ABSTRACT**

In this work was developed a methodology for the extraction, pre concentration and analysis of nitrosamines from samples of canned sausages that were treated with nitrite. With this objective, the vacuum steam distillation was used for the extraction and trapping of the analytes in the water phase.

The pre-concentration step from the aqueous samples was made by SPE and LLE, this last one only for comparative purposes. The SPE was developed in three different ways: with powder active carbon in bath, with granulated active carbon in column and with XAD-4 resin in column. The LLE was made by using dichloromethane as the extractor solvent.

GC was used as one of the analytical techniques, with two detectors: FID (flame ionization detector) and MSD (mass spectrometer detector). The other technique also tested was the MEKC (micellar electrokinetic chromatography).

Best results were obtained by using SPE with granular active carbon in column and analysis by GC/MSD. This kind of methodology allows the extraction and identification of some nitrosamines in the mass of sausages and in the liquid phase at  $\mu\text{g kg}^{-1}$  levels, attending the requirements of the international environmental agencies.

The main compounds that were identified in the samples (Brazilian and Spanish sausages) were Dimethylnitrosamine, Diethylnitrosamine, N-nitrosomorpholine, N-nitrosopiperidine and N-nitrosopirrolidine, being the last one the most abundant.



## 1 - INTRODUÇÃO

---

O problema da presença de nitrosaminas em alimentos pode ser focado como um típico problema ambiental. Historicamente surge da necessidade de conservar os alimentos por mais tempo e evitar o desenvolvimento de microorganismos responsáveis por intoxicações alimentares. Em consequência da interação dos constituintes dos alimentos com alguns aditivos como E249 (Nitrito de Potássio), E250 (Nitrito de Sódio), E252 (Nitrato de Potássio) e E251 (Nitrato de Sódio), através de reações colaterais, ocorre a formação das nitrosaminas<sup>1</sup>.

Desconhecidas e camufladas em concentrações em níveis de partes por bilhão, estas substâncias vêm ao longo dos anos exercendo sua ação carcinogênica e mutagênica sobre diversas espécies animais inclusive o homem.

A questão se torna mais grave quando se verifica que esta família de compostos encontra-se distribuída nas mais diversas matrizes, podendo ainda ser formada endogenamente (*in vivo*).

A primeira denúncia de risco das nitrosaminas como produto cancerígeno data do início da década de 60, porém por muito tempo pouco foi discutido na literatura científica sobre este assunto<sup>1</sup>.

O interesse financeiro da indústria de alimentos combinado ao fato que os tumores gerados por este xenobiótico somente aparecerem 20, 30 anos após o contato crônico, faz com que não existam responsáveis. Acrescenta-se a isto a falta de metodologias analíticas de fácil alcance a laboratórios não tão bem equipados.

O limite de detecção de contaminantes traço em amostras ambientais e de alimentos está continuamente sendo deslocado para níveis mais baixos, pelo aumento da sofisticação do instrumental analítico e pela necessidade de se trabalhar com valores cada vez mais baixos de concentração. As análises estão agora sendo desenvolvidas, rotineiramente, em níveis antes não atingidos, para uma grande variedade de compostos, incluindo desde metais pesados, resíduos de pesticidas, HPAs, Bifenilas policloradas (PCBs) e a classe de compostos N-nitrosos mais comumente conhecida como nitrosaminas<sup>2</sup>.

Este trabalho foi desenvolvido junto ao grupo de Química Ambiental, da UFRGS. Levando em consideração o fato de que o meio ambiente é tudo aquilo que circunda o homem, incluindo as relações e trocas do indivíduo e o cenário no qual está incluído, consideramos a busca de uma metodologia para análise de Nitrosaminas em alimentos também uma questão ambiental.

Neste trabalho estudam-se diferentes caminhos para análise de nitrosaminas em produtos cárnicos tratados com nitrito. Buscam-se sistemas de detecção que já sejam comuns nos laboratórios de análise, ampliando sua aplicação, sem necessariamente implicar em aquisição de novos equipamentos. Estuda-se a destilação a vácuo por arraste de vapor como técnica extrativa. Em função da baixa concentração que estes compostos são encontrados utiliza-se para pré-concentração e *clean up* dos analitos a partir dos destilados e extratos aquosos, a extração em fase sólida (tendo como fases sólidas o carvão ativo e a resina XAD-4<sup>TM</sup>), bem como a Extração Líquido Líquido (LLE) como técnica de comparação foram investigadas. As técnicas usadas são relativamente baratas e de fácil

execução. Como técnicas analíticas utilizaram-se a Cromatografia Gasosa, Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas e Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar (eletroforese capilar). A cromatografia gasosa já é uma técnica bastante difundida enquanto a eletroforese capilar está avançando como concorrente à HPLC, porém, neste caso utilizamos apenas o capilar de sílica fundida, sem fase estacionária, o que representa uma redução em custo.

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS PARA EXTRAÇÃO E  
DETERMINAÇÃO DE NITROSAMINAS EM ALIMENTOS**

**REVISÃO DA LITERATURA**

**PARTE EXPERIMENTAL**

**APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

**CONCLUSÕES**

**BIBLIOGRAFIA**

**PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS**

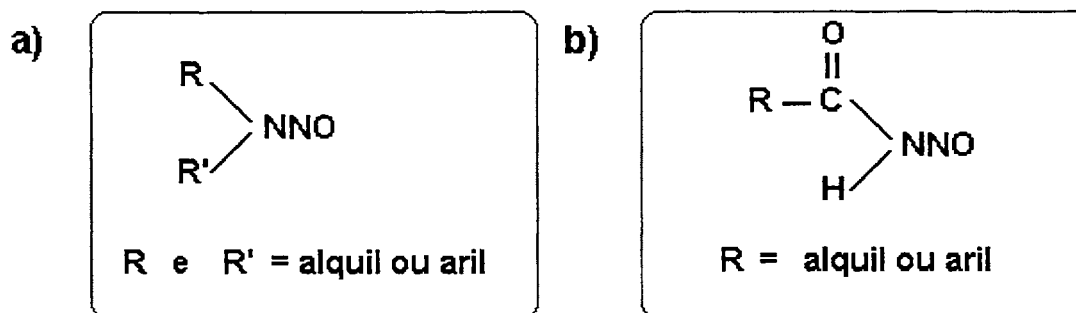
**ANEXOS**

## *2 - REVISÃO DA LITERATURA*

---

### **2.1 NITROSAMINAS: DEFINIÇÃO PROPRIEDADES E ORIGEM**

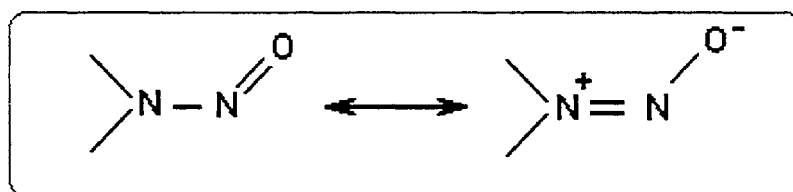
O termo nitrosamina reúne uma grande variedade de compostos N-Nitrosos de diferentes massas moleculares e tipos estruturais que contém o grupo funcional característico N-NO apresentado na Figura 1. Incluem-se neste grupo as nitrosaminas e as nitrosamidas<sup>2-4</sup>.



**Figura 1:** Fórmulas estruturais das (a) Nitrosaminas; (b) Nitrosamidas

A história das nitrosaminas tem início em 1853 com a descoberta de que aminas secundárias reagem com ácido nitroso ou nitrito produzindo um composto chamado nitroso amida<sup>5</sup>. Esta reação passou a ser descrita nos livros textos de química orgânica prática para diferenciar aminas primárias, secundárias e terciárias. Muitas nitrosaminas foram patenteadas como aditivos em lubrificantes e gasolinas e também utilizadas como nematocidas (utilizadas no tratamento de verminoses)<sup>5,6</sup>.

Nitrosaminas são compostos tipicamente orgânicos, sólidos voláteis ou óleos, amarelos devido à absorção da luz visível pelo grupo **NNO**. O elétron deslocalizado no grupo funcional **NNO** (Figura 2), confere suficiente caráter de dupla ligação para a ligação N-N, tanto que isômeros E e Z, resultantes da substituição assimétrica, freqüentemente podem ser separados a baixas temperaturas<sup>3,4</sup>.



**Figura 2:** Deslocalização dos elétrons  $\pi$  do grupo funcional **NNO**

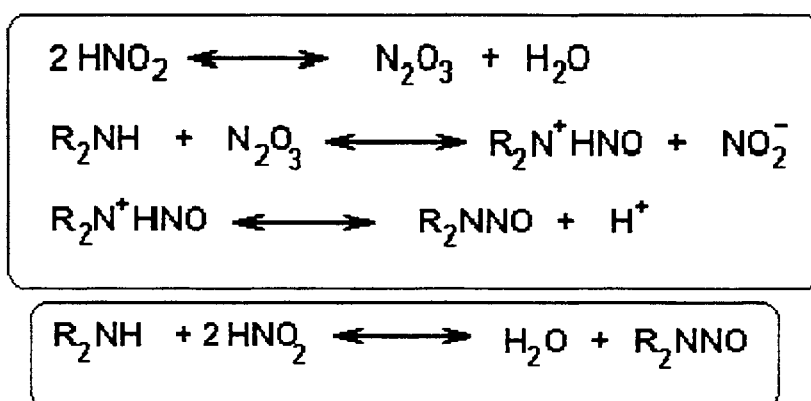
Algumas das principais características espectroscópicas das Nitrosaminas podem ser vistas na Tabela I.

**Tabela I:** Propriedades espectrais características de N-Nitrosaminas

Propriedade (unidade)	Grupo funcional	Valores
UV-Visível (nm)	NNO	230-235 330-375
Infravermelho, (cm <sup>-1</sup> )	estiramento N-N	1040-1160
	estiramento N-O	1430-1500
RMN (ppm)	α CH (E)	(CCl <sub>4</sub> ) 5,8-5,9 (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ) 6,1-6,3
	α CH (Z)	(CCl <sub>4</sub> ) 6,3-6,6 (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ) 6,6-6,8
	Espectro de Massas (u)	Toda a molécula

Fonte: referência 3

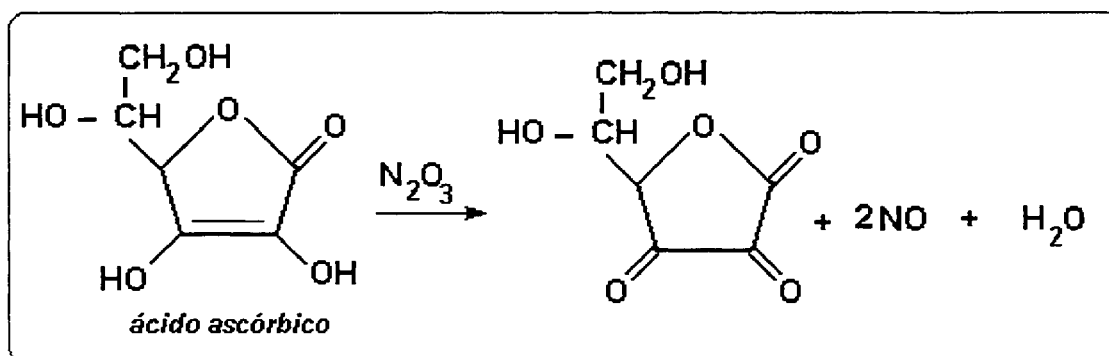
Tanto as aminas como os aminoderivados podem reagir com agentes nitrosantes, como ácido nitroso HONO, nitritos, óxidos de nitrogênio ou sofrerem a ação bacteriana. Formam-se em meio ácido (pH ~ 3), tanto no ambiente quanto *in vivo*, conforme o mecanismo apresentado na Figura 3.



**Figura 3:** Mecanismo e equação geral para síntese de nitrosaminas

Embora ocorra em meio ácido, a espécie química que sofre a reação é a pequena quantidade de amina livre presente, e não o sal<sup>3,4</sup>. Embora os alimentos e o tabaco sejam importantes fontes de exposição, estes compostos N-nitrosos parecem originar-se principalmente *in vivo* através da reação do nitrato com aminas. Em torno de 5% do nitrato ingerido é reduzido a nitrito na saliva, este misturado às aminas encontra junto ao suco gástrico condições favoráveis à formação das nitrosaminas<sup>7</sup>.

Uma vez que as aminas alifáticas são bases mais fortes que as aromáticas elas não podem ser nitrosadas abaixo de pH 3, enquanto que as aminas aromáticas podem<sup>2</sup>. Entretanto a formação destes compostos pode ser inibida pela adição de certas substâncias como ácido sulfâmico, sulfamato de amônio, ácido tânico, alfa tocoferol e ácido ascórbico. Estes compostos competem com as aminas pelas espécies nitrosantes<sup>2,8</sup>. A Figura 4 apresenta a reação entre o ácido ascórbico e o agente nitrosante.



**Figura 4:** Oxidação do ácido ascórbico pelo agente nitrosante

As nitrosaminas uma vez formadas são relativamente estáveis e difíceis de destruir sendo provavelmente um dos agentes cancerígenos mais distribuídos no ambiente. Têm sido estudadas em vários materiais, incluindo gêneros alimentícios, produtos farmacêuticos, amostras ambientais (água, solo, ar etc.), pesticidas, herbicidas, borracha, cosméticos etc<sup>2,9</sup>. A Tabela II apresenta um resumo da ocorrência de Nitrosaminas, reportadas na literatura.



**Tabela II:** Ocorrência de Nitrosaminas

<b>matriz</b>	<b>Referências</b>
<b>Gêneros alimentícios:</b> bacon, presunto, queijos, peixes, farinha de peixe, cervejas	2, 10-13
<b>Produtos farmacêuticos:</b> antistamínicos, tetraciclina, oxitetraciclina, piperazina	2, 14 – 16
<b>Tecidos biológicos:</b> tecidos e órgãos animais, urina, saliva, sangue e soro sanguíneo	2, 7, 15,17
<b>Matrizes ambientais:</b> água, águas residuais, ar, solo	2, 12,15,18–21
<b>Indústria química:</b> herbicidas, pesticidas, fluidos de resfriamento, alcanolaminas	2, 15 22, 23
<b>Outras matrizes:</b> cosméticos, borrachas, detergentes, chupetas, preservativos	11, 18, 24–32

## 2.2 NITROSAMINAS: TOXICIDADE

Este grupo de compostos tem gerado um considerável interesse em função da sua toxicidade. Embora descobertos em 1853, somente em 1956 Magee e Barnes descreveram que a Dimetilnitrosamina apresentava ação carcinogênica, e em 1964 Ender descreveu que a farinha de peixe tratada com nitrito seria a causadora da morte de algumas espécies de animais como as martas, por exemplo, que eram alimentadas com esta ração<sup>5</sup>. Estes fatos desencadearam o início dos estudos das nitrosaminas à ótica de perigosos xenobióticos. Em ovelhas, por exemplo, uma simples dose de 5 mg kg<sup>-1</sup>, ou 12 doses diárias de 0,5 mg kg<sup>-1</sup>, de Dimetilnitrosamina é letal<sup>33</sup>.

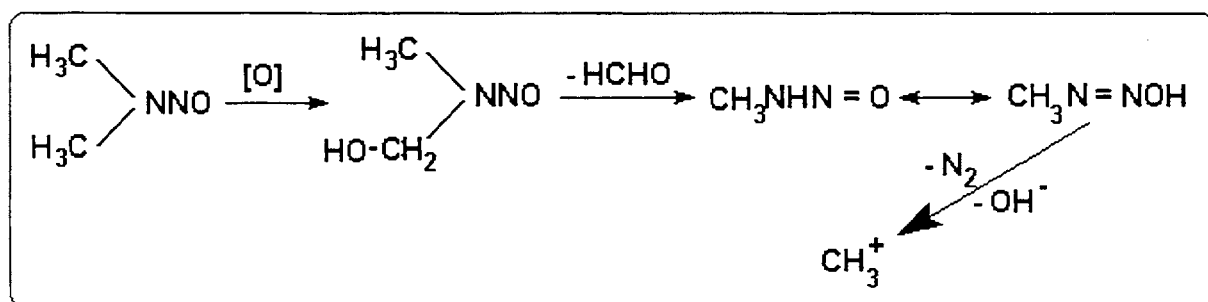
A presença de compostos que retardam a decomposição da nitrosaminas leva a uma queda na toxicidade. Isto tem sido observado através do uso de extratos de certos vegetais como brócolis, cenoura e cebola<sup>8,33,34</sup>.

Acredita-se que o câncer induzido pelo tabaco esteja em parte relacionado com nitrosaminas tais como Nitrosonornicotina<sup>3</sup>. Mitacek e colaboradores desenvolveram um extenso trabalho, analisando sistematicamente, diversos gêneros alimentícios no período entre 1988 a 1996 na Tailândia, sugerindo uma relação entre os níveis de nitrosaminas detectados e a alta incidência de câncer no fígado na população daquela região<sup>35</sup>. Dados epidemiológicos tem evidenciado um aumento do risco de câncer entre trabalhadores da indústria da borracha. Estudos

desenvolvidos por Monarca e colaboradores permitiram a detecção de Dimetilnitrosamina no ar presente neste tipo de indústria<sup>6</sup>.

As alquilnitrosaminas, especialmente, são poderosos carcinógenos, que se tornam metabolicamente ativos pela oxidação e subsequente geração de carbocátions os quais podem alquilar o DNA, conforme o esquema apresentado na Figura 5<sup>36,37</sup>. Estudos têm indicado que as propriedades carcinogênicas de determinadas nitrosaminas estão relacionadas com interações estruturais específicas análogas a interações enzima/substrato ou antígeno/anticorpo apresentando comportamento órgão seletivo. As dialquil nitrosaminas simétricas atacam preferencialmente o fígado enquanto as assimétricas, o esôfago<sup>3,38,39</sup>. O número de nitrosaminas testadas para carcinogenicidade excede a 100, a maioria são carcinogênicas, embora a potência varie significativamente. Por exemplo, a dose tumorogênica para dietilnitrosamina é de 0,0006 mol kg<sup>-1</sup> enquanto da dietanolamina é 1 mol kg<sup>-1</sup>. Os efeitos carcinogênicos têm sido observados em exposições simples a grandes doses assim como grandes períodos de exposição a doses mais baixas<sup>3,39</sup>.

No primeiro estágio da ativação metabólica o Hidrogênio é substituído por um OH ( $\alpha$ -oxidação). O novo grupo formado é eliminado como formaldeído deixando o hidrogênio do grupo CH<sub>2</sub>OH ligado ao nitrogênio, que facilmente migra para o oxigênio do grupo NNO. Em um último estágio ocorre a liberação da metila (carbocátion) que poderá atacar varias moléculas, dentre elas o DNA<sup>3,39</sup>, conforme está demonstrado na Figura 5.



**Figura 5:** Ativação metabólica das nitrosaminas com liberação do carbocátion alquilante

Evidências deste mecanismo estão baseadas no fato que a reação é mais rápida na presença de oxigênio e mais lenta na presença de ar, e ainda que nenhuma decomposição ocorre em atmosfera de nitrogênio. Em experimentos *in vitro* detecta-se a presença de formaldeído a partir da Dimetilnitrosamina e acetaldeído a partir da Dietilnitrosamina<sup>33</sup>.

Existe uma relação direta entre a adição de nitrito e nitrato aos alimentos e a presença das nitrosaminas<sup>1</sup>. Sabe-se desde quase um século que os agentes essenciais para obtenção de carnes curadas são sais de nitrito (Nitrito de Sódio ou Potássio). O nitrito exerce diferentes efeitos conservadores, é responsável pela formação de cor rósea característica das carnes curadas, contribuindo na formação do sabor e odor característicos destes produtos<sup>33,40</sup>.

A interação entre o nitrito e proteínas gera uma nova substância conservante durante o aquecimento. A natureza desta substância conservante não se conhece com exatidão. É denominada como “fator tipo Perigo”, pois foi J. Perigo (1967), quem descobriu seu efeito em meios microbiológicos. Este fator exerce uma ação intensa contra esporos, evitando nos produtos a formação da toxina botulínica unicamente através de um tratamento térmico suave<sup>40</sup>. O nitrito é tóxico a doses moderadas, reage com o sangue para formar a metahemoglobina ou nitrosil hemoglobina destruindo a capacidade do sangue de transportar o oxigênio. Uma dose oral de aproximadamente 1 g é letal<sup>40</sup>.

A agência governamental americana de controle de aditivos em alimentos tem instituído programas para a diminuição do nível residual de nitritos em muitos alimentos. Alguns processos de produção de alimentos agora adicionam vitamina C e vitamina E aos produtos cárnicos (produtos industrializados derivados de carne) com objetivo de inibir a formação de Nitrosaminas<sup>33</sup>.

Em função do potencial mutagênico e carcinogênico das nitrosaminas para animais, estima-se que o nível de exposição tolerável pelo homem para as nitrosaminas mais voláteis encontra-se na faixa de 5 a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (ppb) de peso corporal. Por esta razão o limite de detecção mínimo de 10 ppb é um pré-requisito

essencial para a determinação desta classe de compostos em amostras ambientais e de alimentos<sup>41,42</sup>.

As Tabelas III e IV apresentam um resumo da toxicidade e carcinogenicidade das principais Nitrosaminas encontradas em amostras ambientais e alimentícias.

Quanto à mutagenicidade, as nitrosamidas apresentam esta ação mais pronunciada que as nitrosaminas. Uma justificativa aceitável para este fato é a maior instabilidade das nitrosamidas, as quais, espontaneamente se convertem em um metabólito ativo, enquanto as nitrosaminas necessitam de uma ativação prévia para ocorrer sua ação biológica<sup>3,33,39</sup>.

**Tabela III:** Atividade carcinogênica de algumas Nitrosaminas

Composto	Espécie	Órgãos	Tratamento
Dimetilnitrosamina	Ratos	Fígado, rim e pulmão Sinus nasais	Alimentação, injeção subcutânea Inalação
Dietilnitrosamina	Ratos	Fígado, esôfago, rim	Água, dose oral
	Cães	Fígado	Alimentação e água
	Macacos	Fígado	Dose diária oral a partir do nascimento
	coelhos	Fígado	Água
Dibutilnitrosamina	Ratos	Fígado	Alimentação
Nitrosopiperidina	Ratos	Bexiga esôfago	Alimentação

Fonte: referência 33

**Tabela IV:** Toxicidade aguda para algumas nitrosaminas

Composto	Dose (mg kg <sup>-1</sup> )	Composto	Dose (mg kg <sup>-1</sup> )
Di-n-butilnitrosamina	1200	Nitrosometiluréia	180
Metil-Ter-butilnitrosamina	700	Metil-n-butilnitrosamina	130
Nitrosomorfolina	282	Dimetilnitrosamina	27
Dietilnitrosamina	216	Metilbenzilnitrosamina	18
Metilfenilnitrosamina	200		

Fonte: referência 33

## 2.3 ANÁLISE DE NITROSAMINAS

A determinação de contaminantes traço, tais como as nitrosaminas, requer o isolamento e subsequente concentração do analito a partir da matriz. Assim os métodos de preparação normalmente implicam em substancial redução do volume da amostra e, conseqüentemente, aumento na concentração do analito até o ponto em que ele possa ser detectado pelo instrumental analítico utilizado com os limite de detecção exigidos pela legislação<sup>43-45</sup>. Uma etapa de *clean up* pode também ser requerida para eliminação de interferentes da matriz. O desenvolvimento de procedimentos de análise de traços requer o uso de um número mínimo de etapas no processo, análise de brancos para monitorar a interferência da matriz e estudos de recuperação<sup>41</sup>.

A Tabela V apresenta alguns dos métodos utilizados na análise de nitrosaminas.

Para propósitos analíticos as nitrosaminas são normalmente divididas em dois grupos principais: Nitrosaminas voláteis, aquelas capazes de serem extraídas por arraste de vapor, e Nitrosaminas não voláteis (incluindo polares e não polares). São exemplos do primeiro grupo: N-nitrosodimetilamina, N-nitrosodietilamina e N-nitrosodipropilamina; e do segundo grupo: N nitroso dietanolamina, N nitrosometilestearilamina<sup>2</sup>. O presente trabalho está voltado para o primeiro grupo.

**Tabela V:** Resumo de alguns métodos utilizados na análise de Nitrosaminas

Amostra	analito	preparação	análise	coluna	condições cromatográficas	ref
Dimetilamina	N-Nitrosodimetilamina	Coluna de sílica gel desativada + 25% de água seguida de eluição com DCM.	GC/TEA GC/NPD	Cromossorb 103 10%Carbowax em cromossorb W / AW / DMCS	160°C (isotérmica)	44
Ar	N-Nitrosodimetilamina N-Nitrosodietilamina N-Nitrosomorfolina N-Nitroso-di-n-butilamina. N-Nitroso-di-n-propilamina N-Nitrosopiperidina N-Nitrosopirrolidina	<i>traps</i> concentradores (carvão ativo, alumina, florisil, tenax, sílica e thermossorb-N)	CG/MS – modo SIM  CG/TEA	1. UNACON780B CARBOWAX 20M (capilar)  2. UNACON - Ultrabond 20M (empacotada)	50°C(2min)4°C/min 230°C gás He  70°C(1min) 10°C/min 230°C gás He	46
Tabaco e fumaça de cigarros	N-Nitrosornicotina 4-(N-metil-N-nitrosamino)-1-(3-piridil)-1butanona	Extração ultra-sônica (1 hora com tampão de citrato e DCM)	CG/MS - modo SIM  Cold on column	Sílica fundida-Superox-4	50°C(1min)20°C/min 150°C 4C/min250°C gás He	47

## 2.4 EXTRAÇÃO E PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE NITROSAMINAS

Os métodos de preparação podem ser definidos conforme o tipo de amostra. Normalmente a maioria das amostras necessita de algum tipo de preparação antes da análise. É raro que uma amostra coletada a partir do ambiente possa ser injetada diretamente em um instrumento analítico, sem conseqüências prejudiciais<sup>48</sup>.

Mesmo que a amostra seja adequada para análise direta, freqüentemente os analitos se encontram em concentrações muito baixas para a detecção sem pré-concentração<sup>48</sup>.

Vários procedimentos têm sido utilizados na preparação de amostras. Em matrizes complexas, cada constituinte funciona como um diluente para as nitrosaminas geralmente presentes ao nível de traços. Adicionalmente, cada constituinte pode também agir como um potencial interferente, podendo co-eluir com a nitrosamina de interesse, conduzindo a resultados errôneos<sup>2</sup>. A preparação pode ser necessária para remover ou reduzir os componentes da amostra que possam interferir na identificação dos analitos de interesse.

O desenvolvimento de metodologias aceitáveis para determinação de nitrosaminas ao nível de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (ppb) em alimentos e em outras matrizes passa por dois problemas básicos. quais sejam, a heterogeneidade do grupo e as baixas concentrações presentes em amostras cuja matriz é rica em interferentes que estão em altas concentrações.

A separação inicial deste compostos a partir de diversos gêneros alimentícios tem sido conduzida por extrações com arraste de vapor a partir de soluções alcalinas, ácidas ou neutras, sendo que as extrações a partir de soluções alcalinas são preferidas por restringirem a formação de nitrosaminas durante a extração e apresentarem melhores níveis de recuperação<sup>49-51</sup>. Por outro lado o destilado obtido a partir de soluções neutras ou fracamente ácidas produz extratos mais limpos<sup>51</sup>. A destilação com arraste de vapor sob vácuo, extração direta com solvente e a

solubilização prévia seguida de extração com solvente também têm sido utilizadas<sup>51-52</sup>.

Os níveis de nitrosaminas em produtos cárnicos curados com nitrito são monitorados através de um programa de vigilância USDA's - *Food Safety Inspection Service* (FSIS). Dois métodos de isolamento correntemente são usados no programa de monitoramento FSIS, para análise de nitrosaminas em tecidos. O primeiro método envolve a destilação a vácuo das nitrosaminas a partir de uma mistura de óleo mineral e base. A seguir o extrato obtido é submetido à extração líquido líquido com diclorometano e então é analisado por GC/TEA. As amostras que apresentam níveis de nitrosaminas que violam os limites exigidos são analisadas por um procedimento mais longo. Este inclui destilação a vácuo à baixa temperatura, acidificação do destilado aquoso, extração com diclorometano, lavagem do diclorometano com ácido e com bases, concentração e uma etapa de *clean up* em cromatografia em coluna, e finalmente, o extrato é submetido a uma análise via GC/MS para confirmação dos compostos<sup>42</sup>.

O procedimento indicado pela EPA (*Environmental Agency Protection*) para isolamento e análise de nitrosaminas por GC (8070A) a partir de amostras aquosas, como águas subterrâneas, águas residuais, é também aplicável a matrizes sólidas como solos, sedimentos e lodos. Este método consiste na extração líquido/líquido contínua - método 3520 - seguido de análise e duas colunas cromatográficas diferentes utilizando detector NPD (para nitrogênio e fósforo) ou TEA. Para confirmação dos compostos GC/MS é validado tanto para análise qualitativa quanto quantitativa<sup>53</sup>.

A Tabela VI apresenta as recuperações obtidas para esta metodologia, quando aplicada a amostras aquosas marcadas, cada amostra foi analisada em triplicata, em três ocasiões diferentes. Esta tabela também apresenta o desvio padrão relativo de cada amostra e os limites de detecção quando analisadas em GC/NPD com coluna Carbowax 20M<sup>53</sup>.



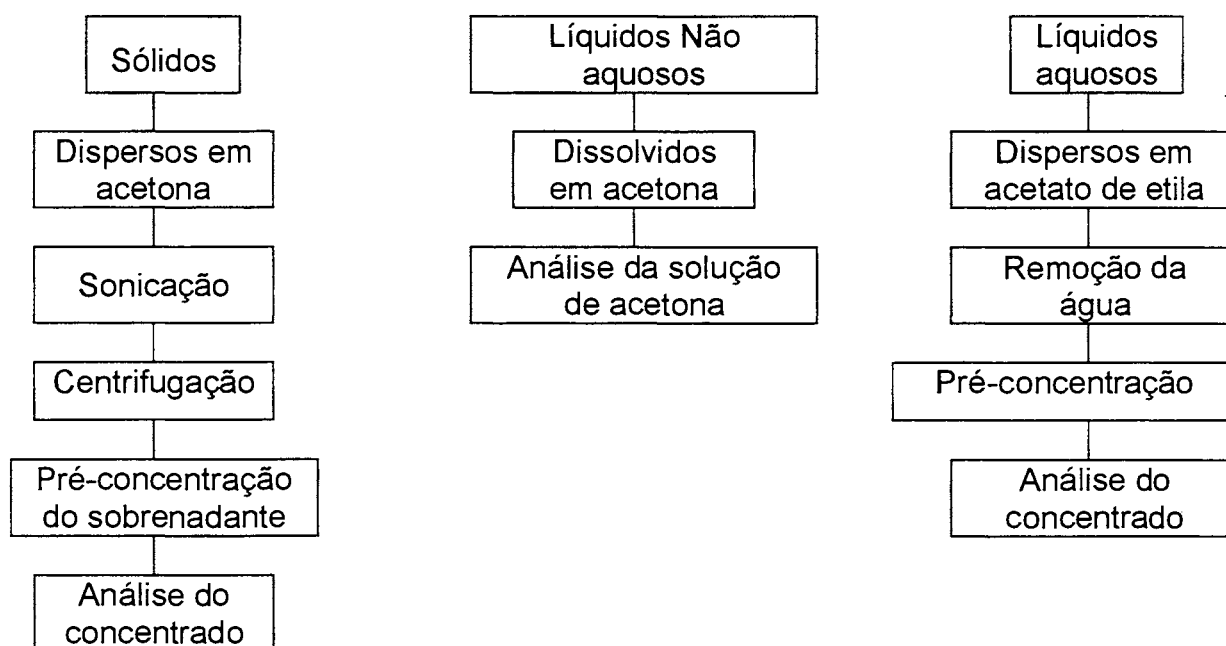
**Tabela VI:** Recuperações descritas pelo método da EPA 7080A para amostras aquosas

Compostos	% Recuperação média	% DP	Quantidade adicionada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Dimetilnitrosamina	32	3,7	0,8
Di-n-propilnitrosamina	79	7,1	1,2
Difenilnitrosamina	61	4,1	9,0

Fonte: Referência 53

Outras técnicas adequadas à extração de nitrosaminas e, mais recentemente desenvolvidas, são a extração e microextração em fase sólida<sup>54-56</sup> e a extração com fluido supercrítico<sup>57-58</sup>.

A Figura 6 apresenta alguns procedimentos para extração de nitrosaminas.



**Figura 6:** Procedimentos comuns para a extração de Nitrosaminas

Fonte: Referência 2 .

### 2.4.1 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO – SFE

Quando uma substância está sujeita a temperaturas e pressões acima do seu ponto crítico, um gás altamente comprimido conhecido como fluido supercrítico se forma. Este fluido apresenta propriedades intermediárias entre líquidos e gases comuns. As extrações com fluidos supercríticos (SFE – *Supercritical Fluid Extraction*) são muito rápidas, pois apresentam boa transferência de massa em função da baixa densidade e alta difusibilidade do fluido supercrítico. Outra característica importante é que o poder solvatante pode ser controlada em função da pressão e temperatura, o que pode conduzir a extrações mais seletivas<sup>57-60</sup>.

O trabalho de Prokopczyk e colaboradores apresenta a SFE como uma alternativa aos procedimentos tradicionais de extração, em função dos baixos volumes de solvente líquido e da velocidade de extração. Neste processo, 700 mg de tabaco foram colocados em um vaso de extração, que depois de selado, foi aquecido a 60 °C sob pressão de 350 atm. O CO<sub>2</sub>, modificado com 10% de metanol foi utilizado como fluido supercrítico. Os analitos foram coletados em frasco contendo 2 mL de hexano<sup>61</sup>.

Maxwell e colaboradores<sup>42</sup> atingiram recuperações entre 84,3 e 104,8% para nitrosaminas voláteis a partir de produtos cárnicos, utilizando um novo arranjo na interface restritor/coletor no extrator de fluido supercrítico. Como fluido extrator utilizaram CO<sub>2</sub> por 17 minutos.

Andúgar e colaboradores<sup>30</sup> apresentaram a otimização dos principais parâmetros para extração de nitrosaminas com fluidos supercrítico a partir de borrachas, seus resultados indicam a SFE como um alternativa viável para extração destes compostos em matrizes poliméricas deste tipo.

Os extratos supercríticos podem ser obtidos a partir de matrizes sólidas ou de adsorventes que foram usados para extrair substâncias orgânicas de meios gasosos ou líquidos<sup>59-62</sup>.

## 2.5 ISOLAMENTO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE NITROSAMINAS A PARTIR DE EXTRATOS AQUOSOS

Os extratos obtidos a partir da amostra normalmente ainda são soluções bastante complexas, onde as nitrosaminas permanecem em concentrações muito diluídas, misturadas às outras substâncias co-extraídas, exigindo, conseqüentemente, procedimentos adicionais de pré-concentração e *clean up*.

Vários são os procedimentos para pré-concentração das nitrosaminas. De maneira geral, estes procedimentos envolvem cromatografia líquida preparativa (PLC) em colunas de sílica e alumina e extração em fase sólida (SPE). Os procedimentos de maior sucesso, produzindo boas recuperações em níveis bastante baixos de nitrosaminas, estão baseados na PLC usando sílica gel. Neste procedimento, as nitrosaminas obtidas por extração com acetato de etila são concentradas em coluna de sílica gel que as adsorve. Os compostos são eluídos da sílica com acetona, concentrados e analisados<sup>2</sup>.

Em outro procedimento processo, Parees determinou Nitrosodimetilamina em Dimetilamina, sugerindo colunas com sistema de circulação externa de água para resfriamento, empacotadas com 35 g de sílica gel desativada com 25%(p/p) de água, para 5 g de amostra. A sílica foi aplicada como emulsão em Diclorometano (DCM), o mesmo solvente utilizado para a eluição das nitrosaminas<sup>44</sup>.

A cromatografia de camada delgada à baixa temperatura também foi utilizada para separação de isômeros de nitrosaminas cíclicas<sup>63</sup>. Para o desenvolvimento do processo foram utilizadas soluções de 5 mg mL<sup>-1</sup> em acetato de etila. Como sistema eluente foi usado éter etílico e uma mistura hexano/THF (3:1). O processo foi acompanhado por análise com Ressonância Magnética Nuclear (NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*).

Em outra referência<sup>64</sup>, descreve-se a separação de nitrosaminas típicas de tabaco utilizando colunas com 30 g de alumina básica ativada (grau III) empacotada em coluna de vidro (15 cm X 15 mm). As nitrosaminas foram eluídas com DCM.

Cartuchos com 20 mg de sílica pré-condicionada com hexano também foram usados para concentrar as nitrosaminas obtidas pela SFE do tabaco. Após serem

lavadas com 3 mL de hexano e 3 mL de DCM, os compostos foram eluídos com DCM contendo 2% de metanol e concentrados a 150  $\mu$ L para análise por Cromatografia Gasosa com Analisador Termoenergético (CG/TEA – *Gas Chromatography with Termal Energy Analyser*)<sup>61</sup>.

Rounbehler e colaboradores fizeram uma avaliação de vários adsorventes, secos e úmidos, para amostragem de nitrosaminas no ar. Dentre os adsorventes sólidos secos estudados estão carvão ativo, alumina ativada, sílica gel, Florisil, Tenax e cartuchos de Termossorb. Entre os adsorventes úmidos (*Wet traps*) foram testados KOH 1 Mol L<sup>-1</sup>, tampão fosfato citrato/ácido ascórbico pH = 4,5. Para o desenvolvimento do estudo, foram utilizados padrões de 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de nitrosaminas em DCM e acetona para a eluição do material retido nos sólidos. As nitrosaminas foram extraídas com DCM<sup>65</sup>. J. H. Zhu e colaboradores utilizaram zeolitos para adsorção de nitrosaminas dispersas em água e em diclorometano<sup>9</sup>.

C. G. Fu e H. D. Xu propuseram um método sensível, seletivo e confiável para análise de Nitrosaminas por HPLC e detecção quimioluminescente. O método combina extração em fase sólida com uma mini coluna de carvão ativo, seguido de eluição com acetona e derivatização com reagente fluorogênico<sup>66</sup>. L. Cardenes e colaboradores em seus estudos propõem o uso de microondas durante a reação de derivatização reduzindo o tempo de análise<sup>67</sup>.

### 2.5.1 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA – SPE

O enriquecimento de compostos orgânicos traço em materiais sólidos tem se tornado uma técnica bastante popular. Alguns atributos desejáveis da fase adsorvente para este processo são:

- possuir elevada área superficial,
- ser quimicamente inerte,
- ter a habilidade de adsorver uma grande variedade de compostos orgânicos a partir de amostras aquosas.

A adsorção em fase sólida, aplicada a amostras aquosas, está baseada na distribuição de compostos dissolvidos entre o adsorvente sólido e a água. A escolha da fase tem que ser adequada, uma vez que o coeficiente de partição está mais deslocado ao adsorvente, de forma análoga à extração líquido-líquido<sup>68</sup>.

Conforme o tipo de adsorvente teremos diferentes fatores de enriquecimento. Se um adsorvente usado é tal que a constante de distribuição dos contaminantes dissolvidos na água favorece a adsorção, todos os compostos presentes em níveis de traços na água serão retidos na coluna liberando a água isenta destes<sup>68</sup>.

Após um certo tempo (após a passagem de um volume de amostra), ocorre a saturação da fase (*breakthrough*) e os compostos começam a eluir junto com a água novamente. Neste momento foi atingido a máxima capacidade de concentração na fase sólida. O estado ideal seria se o aprisionamento do contaminante fosse de 100%. Isto depende de um número de fatores tais como:

- tipo de fase usada,
- tempo de contato
- fator de enriquecimento
- Composto investigado,
- Composição da solução aquosa,
- Composição original dos compostos na água (efeito da matriz).

A SPE é adequada para muitas amostras ambientais, requer equipamentos simples, proporciona um *clean up* superior a LLE, reduz substancialmente o consumo de solvente e reduz o tempo requerido para preparação das amostras para análise. O custo do material por amostra é igual ou, em muitos casos, mais baixo que a correspondente LLE. Por todos estes aspectos a SPE se apresenta como um método superior a extração líquido-líquido<sup>68,43</sup>.

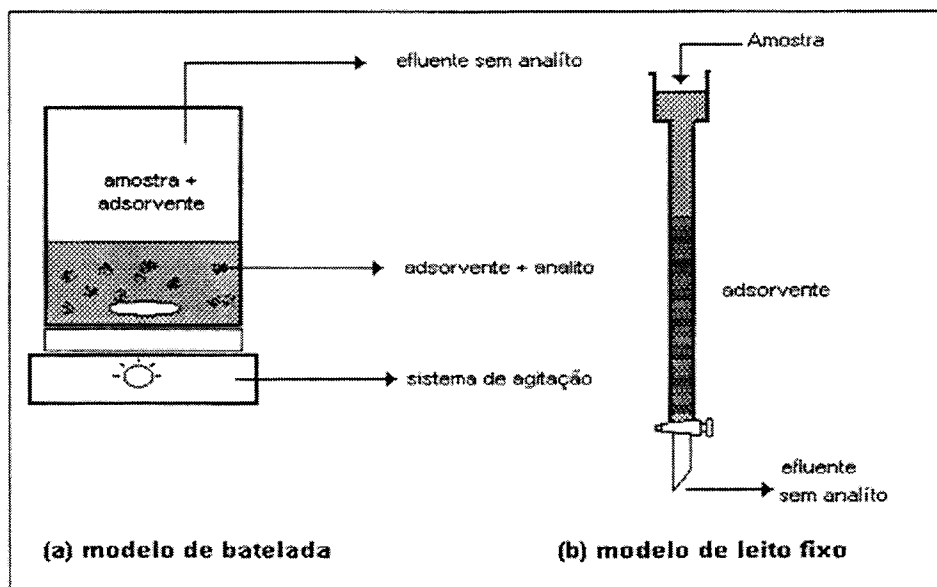
O mecanismo de retenção do analito na fase sólida pode ser considerado de adsorção. A adsorção é um processo através do qual o material é acumulado na

interface entre duas fases. A fase sólida ou fixa é chamada **adsorvente** e o substrato adsorvido é chamado **adsorbato**. A adsorção em suporte sólido tem um grande significado ambiental, uma vez que permite remover poluentes a partir de matrizes aquosas e fluxos gasosos<sup>69</sup>. A aplicação da tecnologia de adsorção para controle de poluentes comuns faz parte da maioria dos casos de controle de poluentes orgânicos, tais como compostos orgânicos voláteis, pesticidas, bifenilas policloradas, etc<sup>70</sup>.

### 2.5.1.1 CONFIGURAÇÃO DO PROCESSO DE ADSORÇÃO

A unidade de configuração mais simples é o sistema em batelada. Neste caso o adsorvente é misturado à amostra sob agitação e deixa-se o sistema atingir o equilíbrio. Ao final, as duas fases são separadas para subsequente tratamento. A principal vantagem é a simplicidade do processo. A adsorção no processo em batelada não é muito comumente usada em função da sua relativa ineficiência, comparada com os processos de configuração em fluxo contínuo. Entretanto continua sendo usada em alguns casos, quando for a única opção disponível, como no caso do uso de carvão ativo em pó<sup>69</sup>. O arranjo mais eficiente para condução da adsorção é conhecido como leito fixo. Neste modo a fase sólida consiste de um leito empacotado do adsorvente através do qual a amostra percola. Conforme a amostra atravessa o leito, o processo de adsorção toma lugar e um efluente limpo abandona a coluna<sup>69,71</sup>.

A Figura 7 representa, esquematicamente os dois tipos de arranjos para a adsorção.



**Figura 7:** Esquema genérico para a adsorção dos analitos por SPE  
(a) modelo de batelada (b) Modelo em leito fixo

### 2.5.1.2 ALGUNS ADSORVENTES UTILIZADOS NA SPE

Um grande número de adsorventes sintéticos com elevada reversibilidade tem sido desenvolvido, embora sua versatilidade e capacidade adsorptivas sejam menores que o carvão ativo. A Tabela VII apresenta algumas fases sólidas utilizadas em SPE.

Em função da utilização neste trabalho descreve-se a seguir algumas características do carvão ativo e da resina tipo XAD-4.

#### 2.5.1.2.1 CARVÃO ATIVO

O Carvão ativo, o mais popular adsorvente, tem tradicionalmente sido utilizado para remoção de odores, sabores e cor, os quais são causados por contaminantes traço. Sua alta capacidade adsorptiva e versatilidade têm expandido sua aplicação ao tratamento de numerosos resíduos industriais. Em geral compostos

orgânicos com massa moleculares maior que  $45 \text{ g Mol}^{-1}$  são bons adsorbatos em carvão ativo<sup>69,72</sup>.

**Tabela VII:** Fases comuns usadas em SPE

Material	Forma*	Tamanho da partícula (mesh)	Área superficial ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Produtos comerciais
	S	20 – 50	330	XAD-2
poliestireno	S	20 – 50	750	XAD-4
	G	60 – 200	300 – 400	Cromossorb
resina fenólica	G	16 – 50	-----	Duolite
éster acrílico	S	20 – 50	450	XAD-7
alumina ativa	G	Variável	235	Alcoa F1, Reynolds, RA1, RA3
sílica gel – magnésia	G	Variável	300	Florisil
sílica gel	G	Variável	300 – 800	Davidson
carvão: base madeira	P	Variável	600 – 1200	Darco KB, G60
carvão: base carvão	G	Variável	500 – 1200	Darco Granular

\* S-esférico G-granular P- pó

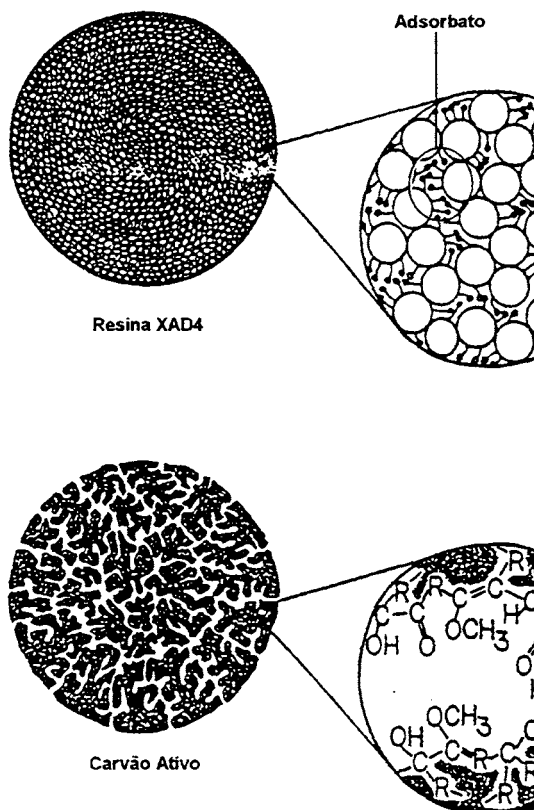
Fonte: referência 69

O carvão ativo é uma forma micro-cristalina de carbono não grafiteado que foi processado para desenvolver maior porosidade interna. É caracterizado por uma grande área superficial de 300 a  $2500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  a qual permite a adsorção física de gases, vapores e substâncias dissolvidas ou dispersas a partir de líquidos ou gases<sup>73</sup>.

Discrepâncias entre a performance esperada de um carvão ativo, baseada na área superficial e nos dados de distribuição do tamanho de poro, e a real capacidade adsorvente, pode ser explicada pelos grupos contendo oxigênio na superfície do carvão. O pH ou pKa do carvão, como uma medida da acidez ou da basicidade da superfície dos grupos contendo oxigênio, pode indicar a hidrofobicidade e as



preferências adsorptivas aniônicas ou catiônicas<sup>73</sup>. A Figura 8 mostra os grupos funcionais presentes na estrutura do carvão ativo.



**Figura 8:** Representação da superfície do carvão ativo e da resina XAD4

Fonte: Referência 69

O carvão ativo é aplicado a um grande número de substâncias removendo efetivamente compostos tóxicos e bio-refratários. É aplicado para extração de inseticidas, herbicidas, hidrocarbonetos clorados, fenóis, compostos tipicamente encontrados em amostras aquosas, e que podem ser reduzidos a níveis aceitáveis por este tratamento<sup>72,74</sup>.

O carvão em pó é mais efetivamente usado em pequenos sistemas de tratamento de água, onde o investimento necessário para o equipamento com carvão granular seja proibitivo<sup>69,74</sup>.

A Tabela VIII apresenta a capacidade adsortiva do carvão ativo, medida em mg de analito por grama de carvão ativo, para vários compostos orgânicos de reconhecida importância ambiental.

**Tabela VIII:** Capacidade adsortiva do carvão ativo para alguns analitos

Analito	Capacidade Adsorptiva*	Analito	Capacidade Adsorptiva*
Fluoranteno	664	Nitrobenzeno	68
DDT	322	N-dibutilftalato	220
Beta naftol	200	N-dimetilnitrosamina	$6,8 \cdot 10^{-5}$
		N-nitrosodifenilamina	220

fonte: referência 49

\* (mg g<sup>-1</sup> de carvão ativo)

Fonte: referência 75

### 2.5.1.2.2 RESINAS TIPO AMBERLYST XAD

As resinas XAD-1, XAD-2, XAD-4 são copolímeros macrorreticulares resultante da reticulação tridimensional do estireno e etilbenzeno, originando um material macroporoso, não iônico, que possui grande área superficial, o que resulta em capacidades adsorptivas superiores à sílica gel e à alumina<sup>76,77</sup>. Não são facilmente molhadas e absorvem pequena quantidade de água em função da sua natureza hidrofóbica. Têm sido utilizadas em vários procedimentos para a adsorção de compostos a partir de matrizes aquosas<sup>78</sup>.

Alquen e colaboradores<sup>77</sup> desenvolveram estudos onde foram avaliadas as resinas XAD-1, XAD-2, XAD-4, XAD-7 e XAD-8 para concentração de ácidos fúlvicos a partir de matrizes aquosa. Concluíram que, no grupo de resinas estudadas, as resinas acrílicas (XAD-7 e XAD-8) apresentaram melhores performances, tanto na adsorção como na eluição dos compostos<sup>77</sup>. Remberg descreveu recuperações na faixa de 60 a 95% para a extração com XAD-4 de hidrocarbonetos halogenados voláteis de matrizes aquosas<sup>79</sup>.

A literatura descreve altas recuperações de compostos orgânicos a partir da água usando resinas do tipo Amberlyst XAD. Seu emprego representa uma melhora

sobre o carvão ativo no sentido de serem mais fáceis de eluir e apresentarem menores riscos de alteração da estrutura química dos constituintes quando adsorvidos<sup>79</sup>.

As resinas XAD-7 e XAD-8 são ésteres de polímeros acrílicos de polaridade intermediária. São molhadas com maior facilidade e absorvem maiores quantidades de água<sup>76,77</sup>. A Tabela VII (página 24) apresenta algumas características das resinas XAD-2, XAD-4 e XAD-7. A combinação de resinas XAD-2, 4 e 7 foram estudadas por Lara e Thomas para isolamento de matéria orgânica marinha dissolvida<sup>80</sup>.

Alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos pelo Grupo de Química Analítica Ambiental do Instituto de Química da UFRGS usando estas resinas na separação de fenóis e cloro-fenóis<sup>81-84</sup>, e compostos orgânicos em chorume de lixiviado de aterro sanitário<sup>85</sup>.

## 2.5.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA – SPME

Na análise de poluentes ambientais voláteis, semivoláteis, fragrâncias e muitos outros analitos, estes podem ser concentrados através de extração líquido-líquido, *purge and trap*, *headspace* ou outras técnicas. Estes procedimentos requerem excessivo tempo, equipamentos sofisticados ou uso de elevado volume de solventes orgânicos. A Microextração em Fase Sólida (SPME), é uma técnica de extração por sorção/dessorção que elimina a necessidade de solvente e manuseio para a pré-concentração de compostos em amostras líquidas ou no *headspace*<sup>65</sup>.

O processo de SPME consiste na adsorção dos analitos de interesse sobre uma fibra de sílica fundida recoberta com um polímero. Os analitos podem ser sorvidos diretamente da solução ou a partir do *headspace*. A técnica produz resultados lineares dentro de uma grande faixa de concentração, é compatível com os injetores de Cromatografia Gasosa e Líquida. A fibra é colocada dentro do injetor de onde os analitos são dessorvidos (termicamente no caso de GC e por solventes no caso de HPLC) para subsequente separação e análise<sup>65,66-90</sup>.

Sen e colaboradores<sup>56</sup> desenvolveram um método analítico para determinação de dibutilnitrosamina e N-nitrosodibenzilamina em presuntos, combinando a extração prévia com arraste de vapor seguida da SPME com fibra de poliacrilato, aplicada ao destilado aquoso.

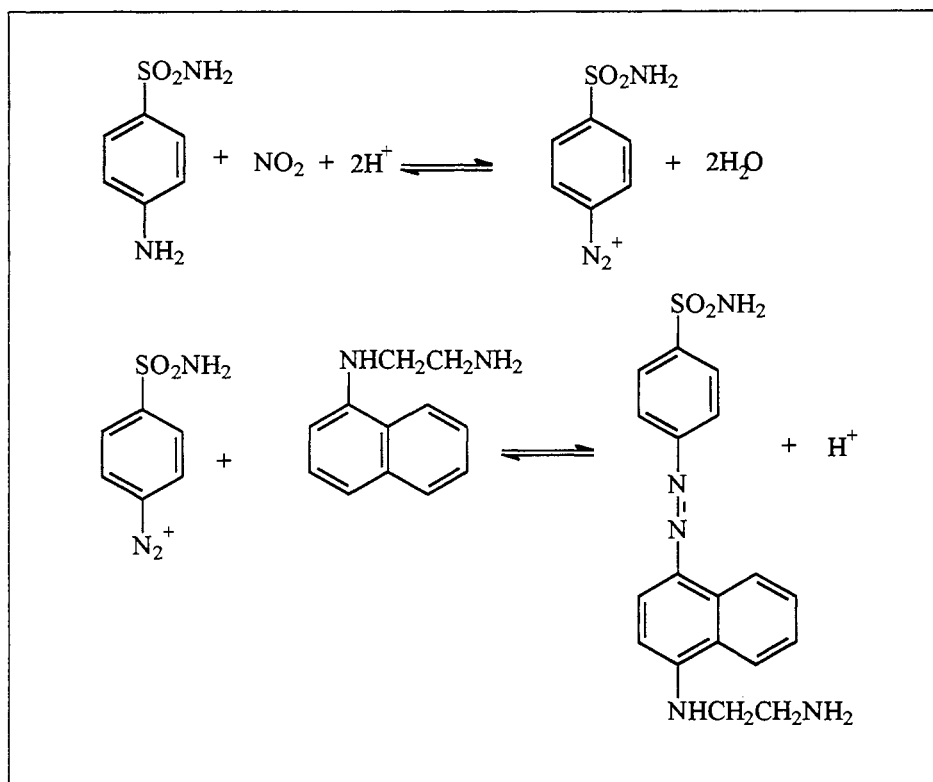
As vantagens desta técnica estão associadas à inexistência de tratamento prévio da amostra, altíssima sensibilidade e ausência de solventes. A maior desvantagem da técnica está na baixa repetibilidade do processo, o que tem limitado sua utilização à análises semi-quantitativas<sup>55,65,86-90</sup>.

### 2.5.3 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO – LLE

Este método consiste na distribuição diferenciada de um soluto entre dois solventes não miscíveis. O grande volume de solvente e o elevado tempo de análise, conseqüências dos inúmeros passos experimentais envolvidos são algumas características que depõem contra este método. Acrescente-se a estas desvantagens, a possibilidade de formação de emulsões, fortemente estáveis, nas amostras de alto peso molecular<sup>70,91-93</sup>. Por estas razões, esta metodologia está sendo substituída por uma das anteriormente citadas, sendo usada atualmente como método de referência para fins comparativos<sup>92</sup>.

## 2.6 TÉCNICAS DE ANÁLISE

As nitrosaminas podem ser quantificadas através de medidas colorimétricas, onde o conteúdo total de nitrosaminas é normalmente expresso em teor de Dimetilnitrosamina. O método colorimétrico é conhecido como reação de Griess, envolve uma denitrosação (química ou física) da nitrosamina com subsequente liberação da espécie nitrosante. Esta espécie reage com uma amina aromática (sulfanilamida) resultando em um sal de diazônio que reagindo com um segundo sistema aromático (N-naftiletlenodiamina) produz um composto cujo máximo de absorção ocorre a 540 nm. A reação está sumarizada na Figura 9:

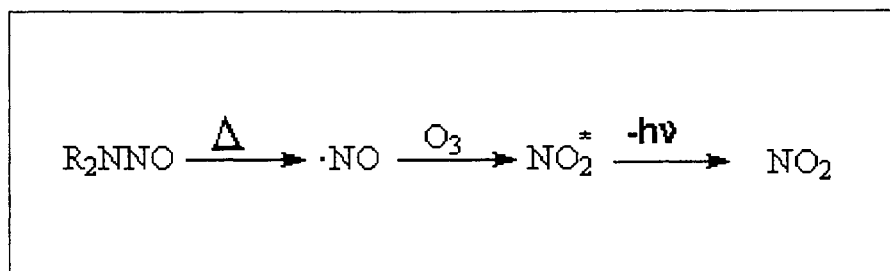


**Figura 9:** Esquema completo da Reação de Griess (Fonte: referência 2)

A reação de Griess é bastante usada para determinações em nível de  $\text{mg kg}^{-1}$  ou maiores, sua utilidade para análise de traços é limitada principalmente pela interferência da matriz<sup>2,94,95</sup>.

A metodologia analítica para determinação de nitrosaminas em níveis de traços tem tipicamente envolvido o uso do Analisador de Energia Térmica (TEA – *Thermal Energy Analyser*) em conjunto com a Cromatografia Gasosa (GC – *Gas Chromatography*) ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*)<sup>2</sup>. O TEA é indicado na literatura como o detector de escolha para análise de algumas nitrosaminas em função da sua elevada especificidade. O composto N-Nitroso dissolvido no solvente adequado é introduzido dentro de um reator catalítico onde é pirolisado sendo a ligação N-NO rompida com a liberação do radical nitrosil ( $\text{NO}^{\bullet}$ ). Este é então oxidado com ozônio em uma câmara de reação sob vácuo gerando o Dióxido de Nitrogênio ( $\text{NO}_2$ )

eletronicamente excitado. Quando ocorre o decaimento energético deste composto voltando ao estado fundamental, é emitida uma radiação característica na zona do infravermelho próximo. A liberação desta energia é conhecida como quimiluminescência e é proporcional à concentração do radical nitrosil<sup>2,33</sup>. A Figura 10 resume estas etapas:



**Figura 10:** Reação de Geração de Quimiluminescência no TEA (Fonte: referência 2)

Detectores fotomultiplicadores captam este sinal cuja intensidade é proporcional à concentração. Entretanto, para operar continuamente, esta técnica requer alto custo inicial, o uso de *traps* resfriados para remoção do eluente e de co-produtos formados durante a pirólise<sup>2,33,96,97</sup>, além de não permitir a operação com materiais em fase reversa nem com soluções tampão inorgânicas utilizadas em HPLC. O processo também apresenta um alto custo de instalação e manutenção, é bastante complexo, possui uso restrito e é suscetível a muitas interferências<sup>2</sup>. Em função disto buscam-se métodos alternativos mais simples e mais baratos.

Borghesani e Locatelli<sup>6</sup> utilizaram a polarografia diferencial para determinação de nitrosaminas em matrizes aquosas obtendo limites de detecção entre 5-10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  utilizando SPE com carvão ativo.

Nitrosaminas voláteis tem sido identificadas em quantidades abaixo de  $\text{mg L}^{-1}$  após separação por cromatografia gasosa utilizando detectores seletivos para nitrogênio, como o Detector Termoiônico de Chama. Os extratos são, muitas vezes, misturas complexas e mesmo após extensivos processos de *clean-up* freqüentemente apresentam outros compostos nitrogenados. Muitos destes apresentarão tempo de retenção característico das nitrosaminas o que no caso do

uso de detectores seletivos para Nitrogênio pode resultar em falso positivo sendo necessária uma confirmação<sup>2</sup>.

Outros tipos de detecção têm sido investigados como HPLC/UV, HPLC/detecção fluorescente, HPLC/MS, GC/FID, GC/NPD, GC/MS. Dos métodos citados com exceção da espectrometria de massas, que tem sido utilizada para confirmação inequívoca da estrutura de nitrosaminas, os demais não são seletivos para a o grupamento N-nitroso<sup>2</sup>.

Para superar estas limitações, pode-se propor a utilização do espectrômetro de massas para identificação dos compostos através da combinação dos tempos de retenção obtidos na separação cromatográfica e dos respectivos espectros de massas<sup>52,98</sup>.

## **2.6.1 DISCUSSÃO DOS MÉTODOS DE DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

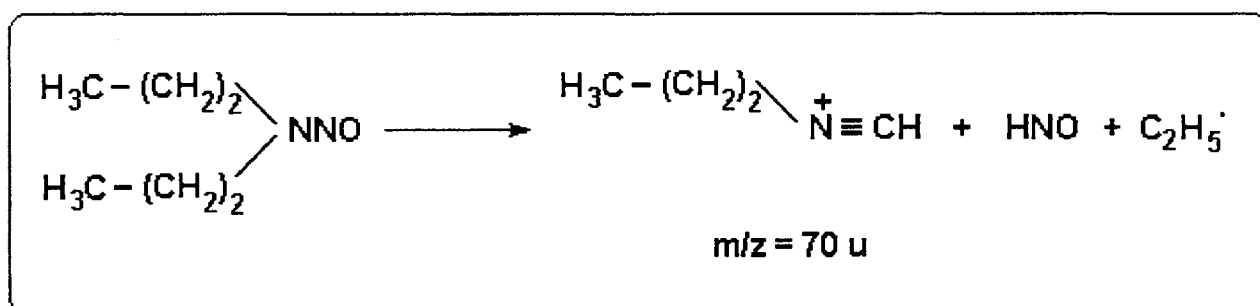
Os procedimentos com espectrometria de massas utilizados para análise de nitrosaminas podem ser divididos convenientemente entre aqueles métodos baseados em alta e os baseados em baixa resolução.

### **2.6.1.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE BAIXA RESOLUÇÃO**

Espectrometria de massas de baixa resolução utiliza o espectro total e está comumente baseada na detecção de vários fragmentos iônicos produzidos pela ionização das nitrosaminas. Podem ser monitorados alguns fragmentos de massa característicos, tornando o método mais seletivo e sensível. No caso da Dimetilnitrosamina, por exemplo, o efluente do cromatógrafo é normalmente monitorado para os fragmentos  $m/z = 30, 42, 74$  sendo o último o íon molecular. A confirmação da presença da nitrosamina está baseada na simultânea ocorrência destes íons junto ao tempo de retenção característico no cromatograma, bem como as intensidades destes íons no espectro de massas do composto. Porém sabe-se que nem sempre a coincidência das intensidades ocorre, em função da coeluição de

alguns compostos que podem apresentar fragmentos comuns (o fragmento m/z 42, por exemplo, é bastante comum em vários compostos)<sup>33,99</sup>.

Para dialquil Nitrosaminas de alto peso molecular ocorre uma quebra em posição  $\alpha$  de um grupo alquil, seguida pela perda do HNO. Por exemplo, o espectro da di-n-propilnitrosamina contém um pico devido ao fragmento iônico 70 u, formado conforme a reação representada na Figura 11<sup>33,99</sup>.



**Figura 11:** Esquema Geral da Fragmentação da di-n-propilnitrosamina

Fonte: referência 33

A Figura 12 apresenta os espectros de massas de baixa resolução, obtidos com um bombardeio de 70 eV, para algumas das principais nitrosaminas voláteis encontradas em diferentes matrizes ambientais e alimentícias.

Um pico correspondente a m/z 27 pode ser encontrado para as nitrosaminas, devido ao HCN formado. Com exceção da Dimetilnitrosamina a maioria das nitrosaminas apresenta um pico proeminente em M -17 devido à eliminação de um radical hidroxila. A Dipropilnitrosamina apresenta o pico m/z 42, o qual se refere ao fragmento  $\text{CH}_2=\text{N}^+=\text{CH}_2$ .

Já para o caso da Dimetilnitrosamina, o pico mais abundante é o m/z 74 (pico molecular) seguido pelos correspondentes a M-HNO e M-H<sub>2</sub>NO (m/z 43 e 42). Muitas nitrosaminas sofrem uma quebra junto a ligação C-N com a formação de alquil íons e seus produtos de fragmentação<sup>33,99</sup>.



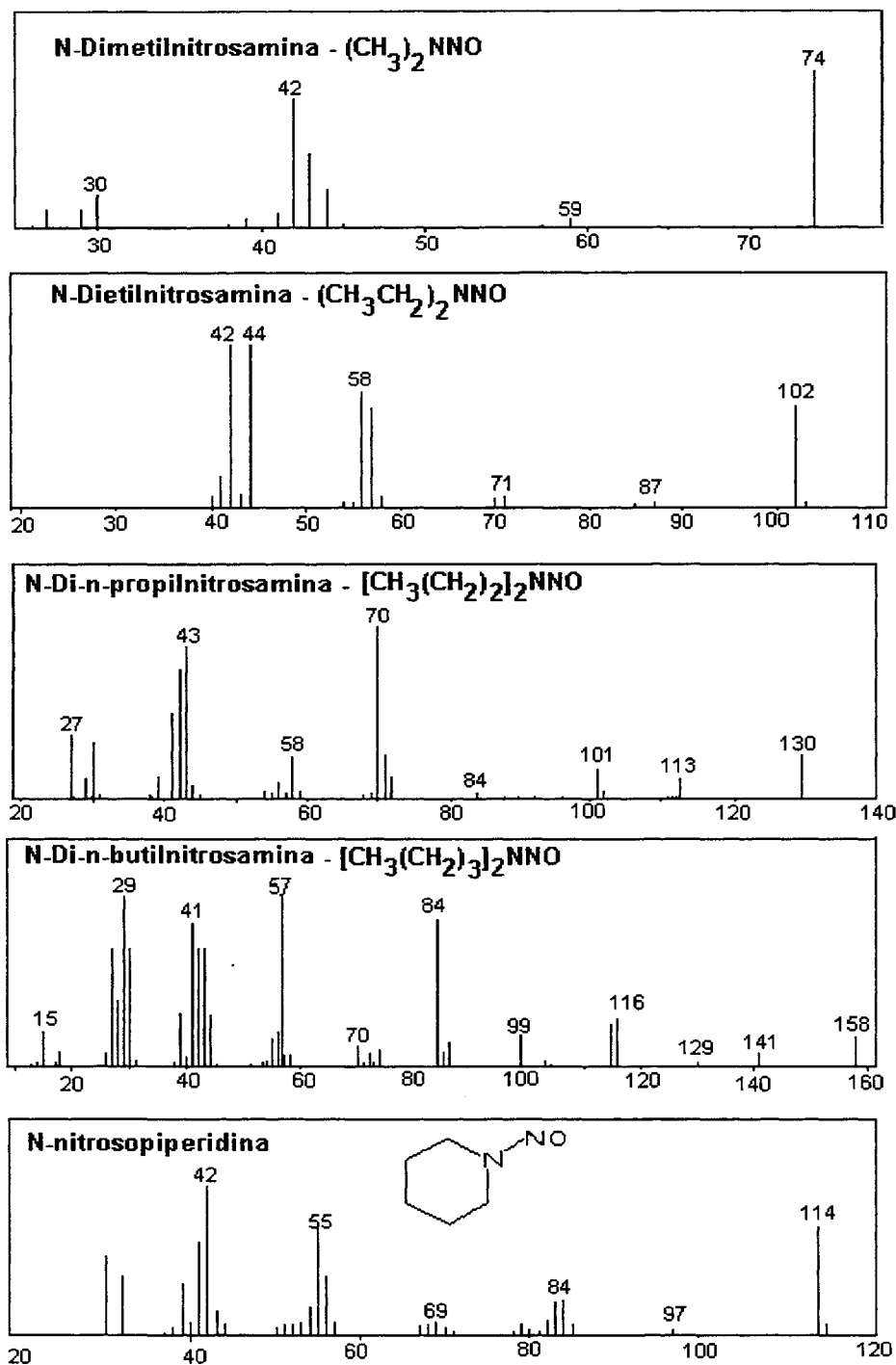


Figura 12: Espectros de massas de algumas nitrosaminas de reconhecida importância ambiental

### 2.6.1.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO

Esta técnica apresenta resultados menos ambíguos para as nitrosaminas do que a espectrometria de massas de baixa resolução. Geralmente os fragmentos iônicos são detectados com precisão de quatro casas decimais, aumentando consideravelmente sua sensibilidade e seletividade<sup>33,99</sup>.

Dois procedimentos tem sido descritos: um monitorando o íon  $\text{NO}^+$ , de  $m/z$  29,9980, o qual é comum a todas as nitrosaminas, ou monitorando o íon molecular de cada composto em análise. O segundo procedimento é mais sensível, pois o íon molecular é, em muitos casos, o pico base ou ao menos apresenta uma substancial abundância<sup>33,99</sup>.

A principal dificuldade associada ao uso da espectrometria de massas de alta resolução está no elevado custo operacional e na alta sensibilidade do equipamento, que exige um ambiente absolutamente limpo para evitar interferências no resultado obtido.

## 2.6.2 ELETROFORESE CAPILAR

### 2.6.2.1 INTRODUÇÃO

A eletroforese capilar continua sendo uma área de pesquisa muito ativa no campo das separações. A rápida expansão, tanto do instrumental como das aplicações, tem demonstrado que a eletroforese capilar é mais do que uma técnica promissora laboratorial. Com o desenvolvimento de técnicas especiais de eletroforese como Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar (MEKC – *Micelar Electrokinetic Chromatography*), e eletrocromatografia capilar, têm aumentado consideravelmente sua aplicação a compostos neutros<sup>100-102</sup>.

As principais vantagens da eletroforese capilar derivam da sua maior eficiência, velocidade, simplicidade e economia, além de oferecer a possibilidade de miniaturização. Tudo isto justifica os esforços da pesquisa na área de eletroforese

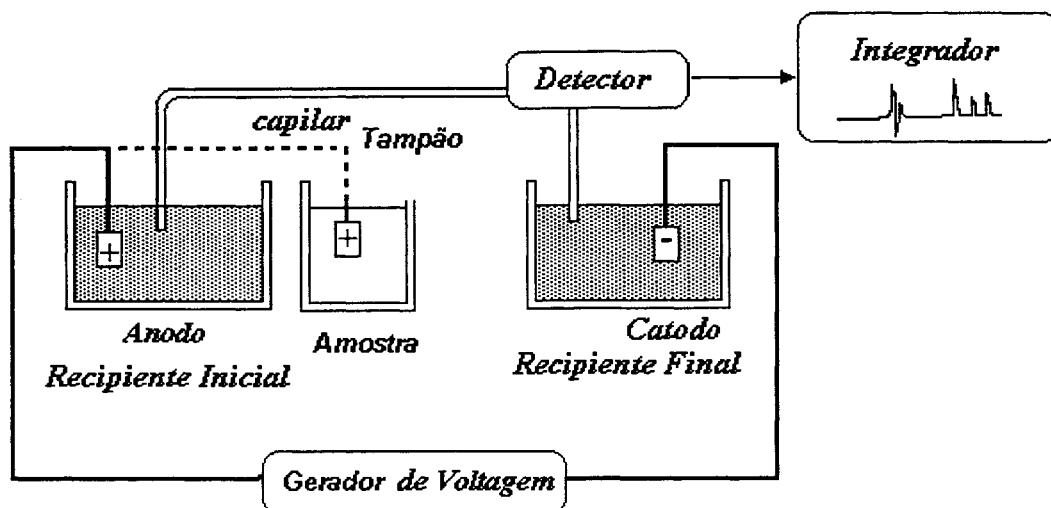
capilar<sup>102</sup>. Esta técnica uma vez que está baseada em um mecanismo de separação diferente dos usuais, oferece informações complementares a outros métodos, e representa uma alternativa para questões que a HPLC e GC não podem resolver<sup>101,102</sup>.

A eletroforese capilar envolve um conjunto de técnicas que utilizam colunas cujo diâmetro varia entre 20-200  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, que produzem separações de alta eficiência tanto para molécula grandes como pequenas. Estas separações são facilitadas pelo uso de altas voltagens as quais podem gerar fluxo eletroosmótico e eletroforético das soluções do tampão e espécies iônicas, respectivamente, dentro do capilar<sup>103</sup>.

A eletroforese capilar oferece um novo formato para cromatografia líquida e eletroforese que:

- Emprega tubos capilares dentro dos quais ocorre a separação eletroforética,
- Utiliza campos elétricos muito altos, freqüentemente maiores que  $500 \text{ V cm}^{-1}$ ,
- Usa detectores modernos que geram registros na forma eletroferograma, semelhante a um cromatograma,
- Tem eficiência na ordem da cromatografia gasosa capilar ou ainda maior,
- Requer diminutas quantidades de amostra (nano litros),
- É facilmente automatizável para análises quantitativas precisas e fácil uso,
- Consome menores quantidades de reagentes quando comparadas a HPLC
- É aplicável a uma grande quantidade de analito comparado a outras técnicas de separação analítica.

A configuração instrumental básica da eletroforese capilar é relativamente simples. Tudo que é necessário é um capilar de sílica fundida o qual deve estar cheio com uma solução de um eletrólito, com uma janela para leitura óptica, uma fonte controlável de alta voltagem, dois eletrodos, dois reservatórios de solução tampão e um detector de UV. A extremidade do capilar é colocado em um reservatório de solução tampão. A janela no capilar, para leitura óptica, deve estar alinhada com o detector. A Figura 13 apresenta um esquema básico com as principais partes do equipamento<sup>103-105</sup>.



**Figura 13:** Esquema geral do equipamento de eletroforese capilar (Fonte: Referência 106)

Considere-se a análise de uma amostra constituída por uma mistura de moléculas neutras e carregadas eletricamente e que estas moléculas carregadas (íons) tenham diferentes carga e tamanho.

Colocando-se a amostra no recipiente anódico e aplicando um campo elétrico, os íons da amostra tenderão a migrar através do capilar, a diferentes velocidades e direções, até chegarem ao extremo catódico onde se encontra o detector. Os cátions migrarão até o eletrodo com carga negativa (catodo) e os íons negativos migrarão até o eletrodo positivo (anodo).

As velocidades de migração dependerão da razão carga/tamanho. Um íon pequeno migrará mais rápido que um íon maior com a mesma carga. As moléculas neutras não serão influenciadas pelo campo elétrico<sup>105-107</sup>.

Esta migração das espécies no interior do capilar é regida por dois fenômenos, concomitantes chamados eletromigração e eletroosmose<sup>100-102</sup>.

### 2.6.2.1.1 Eletromigração

Sob influência de um campo elétrico, cada uma das espécies que formam a amostra migrará a diferentes velocidades através da solução tampão que se encontra dentro do capilar. A esta velocidade se denomina velocidade eletroforética ( $v_e$ ) e se calcula pela seguinte equação:

$$v_e = \mu_e \times E$$

Onde:  $E$  = campo elétrico e

$\mu_e$  = Mobilidade eletroforética.

Se o capilar utilizado para separação tem um comprimento total  $L_t$  e um comprimento efetivo até o detector  $L_d$ , o campo elétrico aplicado estará relacionado com a voltagem e o comprimento do capilar pela equação  $E = v/L_t$ . Portanto as unidades são Volt  $\text{cm}^{-1}$  e a velocidade eletroforético poderá ser calculada<sup>108-110</sup>.

A separação das espécies carregadas é atingida graças às diferenças nas velocidades eletroforéticas de cada uma das espécies, e estas estão em relação com seu tamanho, assim a mobilidade eletroforética é dada por:

$$\mu_e = q/6\pi\eta r$$

Onde:  $q$  = carga do soluto

$\eta$  = viscosidade da solução

$r$  = raio

As unidades da mobilidade são  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Pode-se observar que quanto maior para a relação carga/tamanho, quer dizer  $q/r$ , maior será a mobilidade

eletroforética. As moléculas pequenas com grande carga se moverão mais rápido através do capilar, do que as moléculas de menor carga. Assim também se deduz que moléculas neutras com carga igual a zero terão mobilidade eletroforética igual a zero<sup>108-110</sup>.

### 2.6.2.1.2 ELETROOSMOSE

Sob a influência de um campo elétrico observou-se que além das espécies carregadas que constituíam as amostras, as espécies neutras e a solução tampão também se moviam através do capilar. Este movimento se deve à existência de um outro fenômeno de transporte denominado eletroosmose.

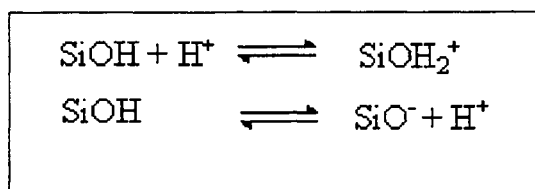
A eletroosmose é um fenômeno básico em todos os processos de separação eletroforética e se pode definir como sendo, o movimento relativo de um líquido com respeito a uma superfície carregada, sob ação de um campo elétrico. Este movimento é o que se conhece como fluxo eletrosmótico<sup>108-110</sup>.

A magnitude do fluxo eletrosmótico depende da composição do capilar e da natureza da solução dentro do capilar.

Quando se coloca uma solução tampão dentro de um capilar, a superfície interna do capilar adquire cargas. Isto pode ser devido à ionização da superfície do capilar ou à adsorção de íons da solução tampão sobre a superfície do capilar, uma vez que o fluxo eletrosmótico tem sido observado tanto em tubos de teflon como em capilares de sílica fundida.

Como o sistema de separação (capilar/solução tampão) tem de ser eletricamente neutro, a solução tampão deverá comportar-se em conjunto como se tivesse a mesma carga e sinal contrário à parede do capilar.

Os capilares de sílica, que são os mais utilizados em eletroforese, apresentam grupos silanóis (SiOH) na sua superfície que se ionizam, gerando grupos que podem estar carregados positivamente (SiOH<sub>2</sub><sup>+</sup>) ou negativamente (SiO<sup>-</sup>) ou ainda podem ser neutros (SiOH) dependendo do pH da solução de eletrólito que os rodeia. A Figura 14 apresenta os mecanismos envolvidos:

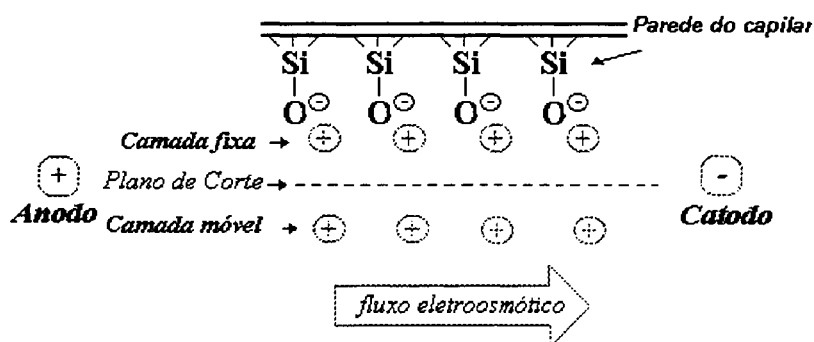


**Figura 14:** Mecanismo de Ionização dos grupos silanóis (Fonte: referência 102)

Em pH menor ou igual a 2,5 a carga é aproximadamente zero o que faz com que o fluxo eletrosmótico seja quase inexistente.

Em geral, para garantir a carga negativa das paredes do capilar, aumenta-se a ionização passando soluções alcalinas como as de NaOH ou KOH através do mesmo antes de introduzir a solução tampão<sup>100-102</sup>.

As cargas negativas dos grupos silanóis atraem as cargas positivas da solução tampão formando uma capa inerte de cátions na parede do capilar, fortemente unida a este, que se denomina camada fixa. Como estes cátions não tem densidade de carga suficiente para compensar todas as cargas negativas, uma segunda camada se adere, a qual, por estar mais distante dos grupos silanóis, está menos fortemente unida aos grupos silanóis e é chamada camada móvel. Estas duas camadas formam a dupla camada difusa de cátions conforme esquema apresentado na Figura 15.



**Figura 15:** Esquema geral da geração do fluxo eletrosmótico no interior do capilar de sílica (Fonte: referência 102)

Quando se aplica um campo elétrico, a camada móvel se vê impulsionada até o cátodo e como os cátions estão solvatados arrastam com eles o conjunto da solução, causando assim o fluxo eletrosmótico<sup>100,110-112</sup>.

Logo o fluxo eletrosmótico se deve à formação da dupla camada elétrica. Entre as duas camadas existe um plano de corte no qual se cria uma descompensação elétrica, que é a diferença de potencial elétrico entre as duas camadas e é definido como potencial Zeta ( $\zeta$ ), cujo valor é dado pela seguinte equação:

$$\zeta = 4\pi\delta\rho/\epsilon$$

Onde:  $\delta$  - espessura da dupla camada

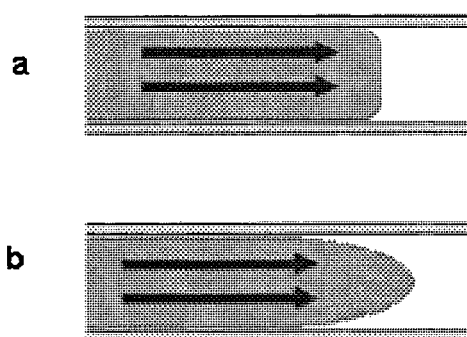
$\rho$  - Carga por unidade de área de superfície

$\epsilon$  - Constante dielétrica da solução tampão

A característica mais importante do fluxo eletrosmótico em um capilar é que seu perfil de velocidade é quase plano, diferente dos sistemas conduzidos por pressão. A comparação entre os dois perfis está apresentada na Figura 16. Nestes, como ocorre em cromatografia líquida de alta resolução, as forças de fricção entre sólido e líquido dão lugar a perfis de fluxo parabólicos, existindo um gradiente de velocidade que é maior no centro e menor nas proximidades das paredes<sup>108,111-113</sup>.

O fato de que o fluxo eletrosmótico tenha um perfil quase plano é muito útil uma vez que significa que todas as moléculas de um mesmo composto, independentemente de sua posição na seção do capilar, vão apresentar a mesma velocidade e eluirão juntas, produzindo picos mais estreitos e aumentando a eficiência<sup>105</sup>.





**Figura16:** Esquema simplificado do Fluxo laminar(a) e do Fluxo parabólico (b)  
(Fonte: referência 102)

### 2.6.2.2 TIPOS DE ELETROFORESE

A eletroforese Capilar compreende uma família de técnicas que tem características operacionais e de separação dramaticamente diferentes. As técnicas são: Eletroforese Capilar de Zona, Enfoque Isoelétrico, Eletroforese Capilar em Gel, Isotacoforese, Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar<sup>103</sup>.

Quando se trabalha com moléculas grandes, tais como ácidos nucleicos, suas mobilidades eletroforéticas podem ser muito similares, e a eletroforese capilar na sua forma mais simples, é freqüentemente, insuficiente para uma resolução adequada, neste caso, as separações são conduzidas em capilares recheados com gel, sendo o tamanho de cada analito decisivo no processo de separação uma vez que este gel funciona como uma peneira, provocando a separação, durante a migração em direção ao detector<sup>104-110</sup>.

Separações eletroforéticas altamente eficientes podem ser obtidas pela adição de substâncias seletivas quirais dentro do eletrólito. A utilização de ciclodextrina (CD) é um exemplo disto<sup>113</sup>.

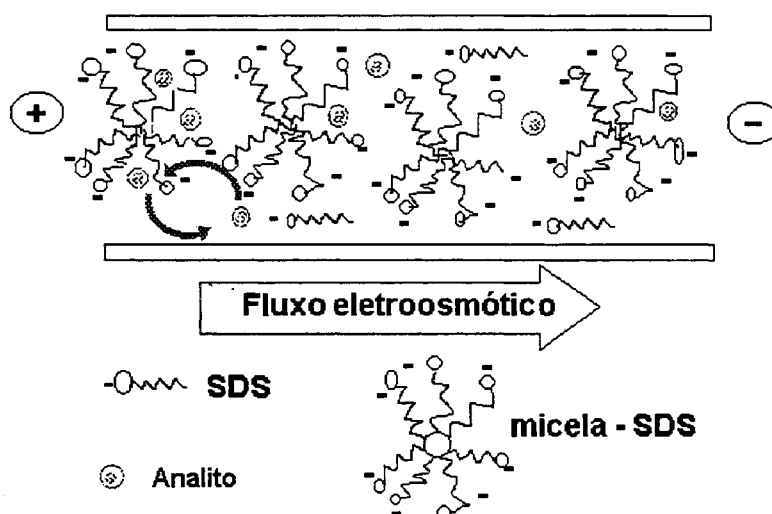
A eletrocromatografia capilar, que corresponde a um híbrido entre eletroforese e HPLC tem sido bastante usada nos últimos anos<sup>103,105,106</sup>. Nesta técnica, o equipamento de eletroforese capilar é utilizado para gerar um sistema de separação

como em HPLC. Os capilares possuem uma fase estacionária e a aplicação da voltagem resulta no fluxo eletrosmótico, bombeando a fase móvel através do capilar.

Como neste trabalho foi usada a Cromatografia Capilar Eletrocinética Micelar, esta modalidade será discutida em maiores detalhes a seguir.

### 2.6.2.2.1 CROMATOGRAFIA CAPILAR ELETROKINÉTICA MICELAR (MEKC – *Micelar Electrokinetic Chromatography*)

Esta técnica é talvez o mais intrigante modo de eletroforese capilar e é usada para determinação de moléculas neutras. Consiste na utilização de micelas de surfactante iônicos que constituem uma fase para separação eletroforética, podendo separar substâncias neutras. O uso de surfactantes formadores de micelas, pode dar origem a separações que reúnem os benefícios da cromatografia líquida em fase reversa com os benefícios da eletroforese capilar<sup>113,114</sup>. A Figura 17 apresenta um esquema dos processos envolvidos durante a separação no interior do capilar.



**Figura 17:** Esquema geral do processo de separação por cromatografia capilar eletrocinética micelar  
Fonte: referência 113

### 2.6.2.2.1.1 MICELAS

As micelas são agregados anfifílicos que se formam a partir de uma concentração característica denominada de concentração micelar crítica (CMC). A produção da agregação se deve à existência de um grupo de “cabeça”, polar, unido a uma “cauda” apolar. Estes agregados encontram-se em equilíbrio dinâmico com as moléculas ou íons individuais, a partir das quais as micelas se formam. Dependendo da natureza do grupo de cabeça polar, os surfactantes podem ser classificados em: catiônicos e aniônicos, zwitteriônicos e não iônicos. As chamadas micelas normais são aquelas que apresentam o grupo orientado para fora<sup>106,110</sup>.

Quando um surfactante aniônico tal como o dodecil sulfato de sódio (SDS – *Sodium Dodecyl Sulphate*) é empregado, a micela migra em direção ao eletrodo positivo pela eletroforese. O fluxo eletroosmótico transporta o volume da solução em direção eletrodo negativo. Este fluxo eletroosmótico é comumente maior que a migração eletroforética da micela sob condições neutras ou alcalinas. Conseqüentemente a micela aniônica também viaja em direção ao eletrodo negativo com uma velocidade retardada<sup>110,114</sup>.

Quando um analito neutro é injetado dentro de uma solução micelar, uma fração desta é incorporada no interior da micela e migra com a velocidade da micela. A fração remanescente do analito permanece livre da micela e migra com a velocidade do fluxo eletroosmótico<sup>110,114</sup>.

A velocidade de migração do analito depende do coeficiente de distribuição entre a fase micelar e a não micelar (aquosa). Um analito neutro deve migrar com uma velocidade entre a do fluxo eletroosmótico e a da micela.

A micela funciona como uma pseudofase estacionária, assim podemos definir o fator de capacidade ( $K'$ ) similar ao de cromatografia<sup>103-110,114</sup>.

$$K' = n_{mc}/n_{aq}$$

Onde  $n_{mc}$  e  $n_{aq}$  são as quantidades de analito incorporado na micela e na fase aquosa. Pode-se obter a relação entre  $K'$  e tempo de migração como:

$$Tr = \frac{1 + K' \cdot t_0}{1 + (t_0/t_{mc}) \cdot K'}$$

O tempo de migração do analito é igual a  $t_0$  quando  $K'=0$ , ou seja, quando o analito não interage com a micela e o tempo de migração torna-se igual a  $t_{mc}$  quando o analito é totalmente incorporado na micela. Define-se assim a janela de tempo de migração como o intervalo de tempo entre  $t_0$  e  $t_{mc}$ <sup>110</sup>.

A concentração do surfactante deve ser relativamente mais alta que a sua concentração micelar crítica. A Tabela IX apresenta alguns exemplos de surfactantes e valores de concentração micelar crítica (CMC)<sup>108-110,114</sup>.

**Tabela IX:** Concentração Micelar Crítica para alguns dos surfactantes mais usados

Surfactante	CMC(25 °C) 10 <sup>-3</sup> Mol L <sup>-1</sup>	Número de agregação
Dodecil sulfato de sódio	8,1	62
Tetradecil sulfato de sódio	2,1(50°C)	138 <sup>b</sup>
Dodecanossulfonato de sódio	40	40

<sup>b</sup> em 0,10 Mol L<sup>-1</sup> de NaCl

### 2.6.2.3 CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO A SEREM OTIMIZADAS

Um dos principais requisitos da eletroforese capilar é detalhar totalmente os parâmetros de operação de um procedimento método analítico. Os detalhes deste método podem ser gravados em um microcomputador, que controlará o equipamento de eletroforese capilar e seu auto-amostrador. Dentre os parâmetros a serem detalhados destaca-se o tipo de capilar, a temperatura, o comprimento de onda para registro, os modos de injeção e a voltagem de separação, bem como a otimização do tampão.

#### 2.6.2.3.1 O CAPILAR

Os capilares são, basicamente, feitos de sílica fundida podendo apresentar diferentes revestimentos internos como forma de modificar o fluxo eletroosmótico e aumentar a seletividade de determinado método. O diâmetro interno do capilar deve ser especificado porque suas dimensões afetam vários fatores incluindo, sensibilidade, volume injetado por segundo, corrente gerada durante a separação. Ambas, distância total do capilar e distância ao longo do capilar na qual a detecção é conduzida, também devem ser definidas. Alguns capilares têm a zona de detecção modificada (como uma bolha) e isto deverá vir indicado. É essencial apresentar as especificações completas da preparação e composição do eletrólito, bem como o tratamento inicial e tratamento para armazenar o capilar. Os capilares comumente utilizados apresentam um diâmetro interno de 25 a 75  $\mu\text{m}$  por 20 a 75 cm de comprimento e o material do capilar é a sílica fundida devido à sua transparência ao ultravioleta, durabilidade e valor de potencial zeta<sup>108-111</sup>.

Um capilar novo deve ser condicionado antes de ser utilizado, para isto lava-se em um primeiro momento com HCL 5 minutos  $1 \text{ mol L}^{-1}$  seguido de NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  por 10 minutos, com água por 5 minutos e com o tampão por mais 10 minutos. Este procedimento de condicionamento é importante para assegurar que a superfície interna do capilar esteja total e uniformemente carregada. Em alguns casos componentes da amostra tais como proteínas podem ser adsorvidos na

parede do capilar, causando trocas na seletividade em níveis variáveis de fluxo durante as injeções. Nestes casos é necessário regenerar a superfície do capilar entre as análises, pela passagem de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e, em casos extremos, com NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>. Uma vez que a solução micelar apresenta uma condutividade relativamente alta, um capilar com pequeno diâmetro é favorável para evitar o excessivo efeito Joule. A distância não é tão crítica, mas capilares demasiadamente longos resultam em tempos de análise também demasiadamente longos. Quando se utilizam capilares com grande diâmetro aumenta-se a capacidade de amostra, porém um eficiente resfriamento do capilar é exigido<sup>108-111</sup>.

#### **2.6.2.3.2 VOLTAGEM APLICADA**

Tanto a velocidade eletrosmótica como a eletroforética são diretamente proporcionais à força do campo, logo o uso de voltagens mais baixas resultará em tempos de análise mais longos. A teoria prediz que tempos de separação curtos produzirão altas eficiências, uma vez que a difusão é um dos fatores mais importantes para o alargamento dos picos. O valor da voltagem limitado pelo efeito Joule. Experimentalmente a voltagem ótima é determinada pela repetição de análises de um padrão em voltagens crescentes até perda da resolução<sup>108-111</sup>.

#### **2.6.2.3.3 TEMPERATURA**

A temperatura afeta o volume de injeção, tempos de migração e o nível de corrente gerada, assim o analista deve manter fixo o seu valor durante as operações de rotina.

Para analitos pequenos, trocas na seletividade com a temperatura originam-se a partir de efeitos secundários nas propriedades dos analitos, tais como solvatação, pKa, e equilíbrios com os agentes de interação (SDS, CD). Para moléculas grandes a seletividade pode ser fortemente influenciada pelo efeito da temperatura na conformação dos compostos, por exemplo, o DNA<sup>108-111</sup>.

#### 2.6.2.3.4 O ELETRÓLITO SUPORTE – SOLUÇÃO TAMPÃO

A otimização do eletrólito suporte que constituirá “a fase móvel” do processo de separação é um dos passos mais importantes no desenvolvimento de um procedimento eletroforético. Busca-se o sistema de separação mais simples possível, pois são mais fáceis de desenvolver e reproduzir, mais estáveis, e mais fáceis de modificar no caso de amostras reais<sup>108-113</sup>.

O sistema de separação deve apresentar concentrações moderadas na ordem de 5 a 50 mMol L<sup>-1</sup>. Tampões muito concentrados, com altas condutividades elétricas podem gerar grandes quantidades de calor no interior do capilar, o que pode interromper a corrida ou alterar os efeitos de interação entre os agentes de seletividade e o analito. Por outro lado a capacidade de tamponamento de soluções muito diluídas é baixa. É recomendável que o sistema gere correntes menores que 75  $\mu$ A, preferencialmente, 50  $\mu$ A<sup>108-113</sup>.

#### 2.6.2.3.5 pH

O primeiro agente de seletividade para considerar é o pH, muitos analitos são bases, ácidos ou anfólitos, assim seus valores de pKa controlam sua mobilidade. A seletividade baseada no pH está também relacionada com controle do fluxo eletroosmótico, conforme já referido anteriormente no item 2.6.2.1.2. O pH influencia as interações dos analitos com outros constituintes do tampão<sup>105,108-111</sup>.

#### 2.6.2.3.6 ADIÇÃO DE SOLVENTES ORGÂNICOS

Solventes orgânicos como acetonitrila ou metanol são freqüentemente adicionados ao tampão entre 5 e 10%. O objetivo é, principalmente, aumentar a solubilidade do analito, mas a seletividade também pode ser afetada, isto é mais comum quando agentes de interação, como as ciclodextrinas, estão presentes. De maneira geral os solventes orgânicos retardam o fluxo eletroosmótico<sup>101,111</sup>.

### 2.6.2.3.7 AGENTES DE INTERAÇÃO – CICLODEXTRINAS (CD)

As ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos, consistindo em seis, sete ou oito unidades de glicose, recebendo os nomes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$  ciclodextrinas, respectivamente.

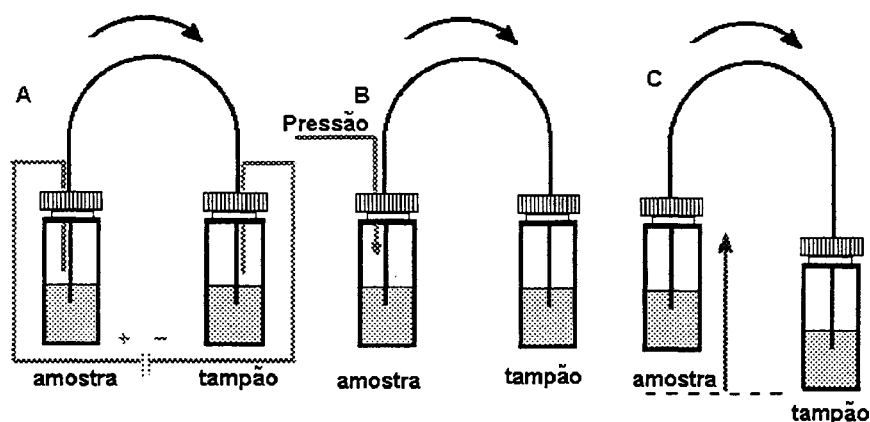
A cavidade interna da CD tem caráter hidrofóbico, o que a torna capaz de formar complexos com grupos aromáticos e alquílicos. O aumento da seletividade devido ao uso de ciclodextrinas se atribui, normalmente, a sua habilidade para incluir seletivamente uma grande variedade de moléculas orgânicas e inorgânicas, além de íons, em sua cavidade hidrófoba<sup>110</sup>.

A estabilidade do complexo de inclusão dependerá de fatores como as pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, efeitos do solvente, tamanho e forma da molécula. As CD são originalmente neutras e sua parte externa é hidrofílica, portanto pode-se assumir com segurança que as ciclodextrinas não interagem com as micelas quando utilizadas em Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar<sup>110-112</sup>.

### 2.6.2.3.8 INJEÇÃO

O método mais comumente usado para a injeção da amostra é por pressão diferencial. Neste método uma pressão positiva ou negativa é exercida dentro do recipiente da amostra o que faz com que a amostra seja empurrada ou drenada, respectivamente, para dentro do capilar. O volume injetado é dependente do tempo e do nível de diferença de pressão, conforme pode ser visto na Figura 18B.





**Figura:18:** Tipos de injeção em eletroforese capilar (A) Injeção Eletrocinética, (B) Injeção por Pressão e (C) Injeção por Sifonagem.

Por sifonagem (Figura 18C), o capilar é mergulhado dentro da solução da amostra e é mecanicamente levantado resultando em um fluxo de sifonagem causado por gravidade. O volume injetado assim é dependente do tempo de amostragem e da diferença de altura entre as extremidades do capilar. Os volumes injetados por ambos, pressão e sifonagem, são também dependentes da viscosidade da amostra. Os volumes típicos de injeções hidrodinâmicas estão na faixa de 10 a 50 nL<sup>105,110</sup>.

Na injeção eletrocinética, representada na Figura 18A, o analista coloca o capilar e o eletrodo na solução da amostra e aplica uma voltagem, os constituintes da amostra entram no capilar em função da sua carga iônica, sendo varridos pelo fluxo eletrosmótico para dentro do capilar. Conseqüentemente o número de íons que entram no capilar é dependente de uma grande variedade de fatores, tais como nível de polaridade e duração de voltagem aplicada, pH do eletrólito, dimensões do capilar, carga iônica do soluto e viscosidade da amostra. Todos estes fatores levam a uma injeção mais seletiva<sup>110-113</sup>.

#### 2.6.2.4 ELETROFORESE CAPILAR NA ANÁLISE DE NITROSAMINAS

Para separações de compostos hidrofílicos, de baixo massa molecular, neutros e polares, como as nitrosaminas, existe a necessidade de desenvolver técnicas que aumentem a seletividade. A principal razão é que estes compostos não interagem fortemente com os surfactantes mais comuns utilizados em cromatografia capilar eletrocínética micelar, como dodecil sulfato de sódio (SDS) ou outros modificadores dos tampões, como as Ciclodextrinas<sup>115</sup>.

Existe um grande número de métodos já bem estabelecidos para separação de uma grande variedade de analitos, entretanto muitas classes de compostos, como as nitrosaminas, necessitam de maiores estudos para que suas separações sejam atingidas em equipamentos comerciais<sup>115</sup>. A eletroforese capilar representa uma alternativa para analisar diretamente amostras aquosas, as quais não podem ser analisadas quando se usa a cromatografia gasosa.

Ng et al<sup>110,115</sup> descrevem a separação de nitrosaminas com o uso da MEKC e usando uma combinação de capilares de sílica e porções de capilares contendo fases estacionárias, conectados entre si, obtendo significativa melhora na seletividade na separação para diferentes fases.

Janini et al<sup>110</sup> investigaram a separação de um grupo seletivo de nitrosaminas heterocíclicas por Eletroforese Capilar. Trabalhando em baixas temperaturas, melhoraram a resolução obtendo separações dos confômeros *SIN* e *ANTY*.

### 2.7. PROPOSTA DE TRABALHO

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de nitrosaminas em produtos cárnicos tratados com nitritos. Para tanto utilizamos amostras aquosas sintéticas (misturas padrão) e amostras de salsichas enlatadas obtidas comercialmente.

O procedimento desenvolvido faz uso de extração a vácuo com arraste de vapor para separar inicialmente os analitos da matriz sólida. Para pré-concentração e *clean up* dos destilados utilizamos a Extração em Fase Sólida com carvão ativo (em pó e granular) e resina XAD-4. As técnicas analíticas usadas são a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução e um novo procedimento analítico por Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar – MEKC utilizando capilares de sílica em equipamentos comerciais, expandindo as aplicações destes.

## ***3 - PARTE EXPERIMENTAL***

---

---

### **3.1 REAGENTES**

Todos os reagentes utilizados foram grau analítico ou superior, fornecidos por Fluka e Sigma-Aldrich.

Os solventes usados foram de grau p.a., Merck ou similar, bidestilados e avaliados cromatograficamente.

Para o desenvolvimento do método eletroforético foram utilizados dihidrogenofosfato de sódio dihidratado, tetraborato de sódio decahidratado,  $\gamma$ -ciclodextrina (CD), dodecil sulfato de sódio (SDS), hidróxido de sódio, ácido clorídrico e ácido fosfórico.

No processo de extração a vácuo por arraste de vapor, utilizamos cloreto de sódio e carbonato de potássio. Sulfato de sódio anidro, purificado em forno mufla a 300 °C, foi empregado para secar os extratos orgânicos.

### 3.1.1 ADSORVENTES

Para extração em fase sólida e pré-concentração dos analitos a partir de amostras aquosas foram usados o carvão ativo (em pó e granular) e a resina Amberlyst XAD-4<sup>TM</sup>. Estes dois adsorventes foram adquiridos da Sigma Aldrich.

#### 3.1.1.1 CARVÃO ATIVO (CA)

O carvão ativo (em pó 100 – 400 mesh e granular 8 – 20 mesh) foi previamente extraído por 24 horas em Soxhlet com diclorometano e seco em estufa a 105 °C. Para controle da limpeza dos adsorventes foram realizados testes em branco com água bidestilada. Para os testes em branco usou-se 1 g do carvão ativo e 25 mL de água bidestilada. A adsorção do CA em pó foi feita por agitação (processo em batelada) de 1 g do adsorvente, durante 45 minutos, com os 25 mL de água bidestilada. Enquanto que para o CA granulado usou-se o empacotamento de 1 g do adsorvente em uma coluna de vidro com 20 cm de comprimento por 1,1 cm de diâmetro, sendo os 25 mL de água percolados através da coluna. A seguir, em ambos os casos, dessorveu-se os analitos do CA com 10 mL de acetona e 10 mL de diclorometano, sendo estes concentrados em banho de gelo a 1 mL, secos em sulfato de sódio anidro e cromatografados.

#### 3.1.1.2 RESINA XAD-4

Para purificação e avaliação da resina XAD-4 (20-50 mesh, superfície ativa de 750 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, diâmetro médio de poro de 50 Å) foi utilizada a técnica descrita por pissolato<sup>81</sup>. A resina macroporosa XAD-4 foi pré-purificada via refluxo em Soxhlet com acetona (5 horas), com metanol (5 horas) e ainda com diclorometano (5 horas) e finalmente seca em forno à temperatura de 80 °C por 3 horas. Neste procedimento de purificação, 1 g da resina foi condicionada com água destilada e disposta em uma coluna de vidro (25 cm × 1,1 cm). Fez-se passar 10 mL de diclorometano (DCM) bidestilado com fluxo de 5 mL min<sup>-1</sup>, este foi recolhido, seco com 6 g de sulfato de

sódio anidro, concentrado até 1 mL e cromatografado, para verificar a pureza da resina.

### **3.1.2 PADRÕES**

Os padrões foram escolhidos a partir da listagem dos poluentes orgânicos prioritários da US-EPA (Agência de Proteção Ambiental Americana).

Os padrões de nitrosaminas (99,99% de pureza) estudados foram: dimetilnitrosamina (DMN), dietilnitrosamina (DEN), metiletilnitrosamina (MEN), dipropilnitrosamina (DPN), dibutilnitrosamina (DBN), N-nitrosomorfolina (NMOR) N-nitrosopirrolidina (NPIR), N-nitrosopiperidina (NPIP) e, como padrão interno, usou-se uma solução de bifenila. Os compostos e suas fórmulas estruturais estão apresentados na Tabela X.

Soluções estoques a 1000 mg L<sup>-1</sup> de cada analito foram preparadas em metanol e mantidas no escuro em refrigerador a 4 °C.

## **3.2 EQUIPAMENTOS**

### **3.2.1 EXTRAÇÃO**

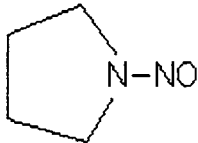
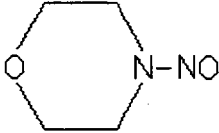
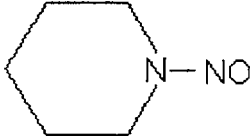
Para destilação a vácuo com arraste de vapor das amostras sólidas e líquidas foi usado um rotavapor Eyela NE-1.

### **3.2.2 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

#### **3.2.2.1 CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR POR IONIZAÇÃO EM CHAMA (GC-FID)**

Foram usados dois cromatógrafos: HP 5890 - série II, com uma coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), e Shimadzu GC 17 A com uma coluna HP-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

**Tabela X:** Nitrosaminas usadas como padrões neste trabalho

Nome	Símbolo	fórmula molecular	Massa molecular	fórmula estrutural
Dimetilnitrosamina	DMN	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> NNO	74	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NNO
Metiletilnitrosamina	MEN	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NNO	88	(CH <sub>3</sub> )(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> )NNO
Di-n-propilnitrosamina	DPN	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> NNO	130	(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NNO
Dietilnitrosamina	DEN	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> NNO	102	(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NNO
N-nitrosopirrolidina	NPIR	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> NNO	100	
Di-n-butilnitrosamina	DBN	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> NNO	158	(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NNO
N-nitrosomorfolina	NMOR	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	116	
N-nitrosopiperidina	NPIP	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NNO	114	

### 3.2.2.1 CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MSD)

Foi usado um equipamento Shimadzu QP5050A, com dois tipos de coluna HP-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e Carbowax 20 M (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

### **3.2.3 ANÁLISE POR MEKC**

Os experimentos foram conduzidos em um equipamento de eletroforese capilar Beckman P/ACE 5500 CE Instruments com detector de arranjo de diodos. Usou-se um capilar de sílica para separação e quantificação dos analitos. O sistema compreende uma fonte geradora capaz de produzir de 0 a 30 kV e o software PACE para o processamento e registro dos dados. O capilar utilizado (sílica fundida) foi obtido da Beckman Instruments (Fullerton, CA, USA).

## **3.3 AMOSTRAS**

### **3.3.1 AMOSTRAS SINTÉTICAS**

Foram usadas soluções aquosas de padrões de nitrosaminas (10 a 1200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), preparadas a partir de diluições da solução estoque com água ultrapura (MILI Q- System millipore, bedford, M A).

### **3.3.2 AMOSTRAS REAIS**

As amostras usadas foram salsichas enlatadas (comerciais), sendo analisado o líquido de conserva e a massa da salsicha

Amostra A – Salsicha de marca brasileira, adquirida, aleatoriamente, em supermercados na cidade de Porto Alegre/RS/Brasil.

Amostra B – Salsicha de marca espanhola, adquirida, aleatoriamente, em supermercados na cidade de Córdoba/Espanha.



### 3.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS

Para otimização das condições de análise (temperatura de vaporizador e detector, modo de injeção, programação do forno) no sistema GC/FID, utilizou-se uma solução padrão a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  contendo 8 nitrosaminas padrões (DMN, MEN, DEN, DPN, NMOR, NPIR, NPIP e DBN).

A partir da solução estoque ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) da mistura padrão de nitrosaminas, foram preparadas soluções em Diclorometano a 5, 10, 15, 20, 25 e  $30 \text{ mg L}^{-1}$ . Todas receberam  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de bifenila (padrão interno) em diclorometano e foram cromatografadas. Foram construídas curvas de calibração registrando a área relativa de cada composto (AR) a qual representa a razão entre a área do analito e a área do padrão interno.

Para otimização das condições de análise no sistema GC/MSD, foram usadas soluções de nitrosaminas padrões, em DCM, na faixa de concentração de  $250 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  a  $30 \text{ mg L}^{-1}$  com  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de padrão interno, trabalhando em modo SCAN e SIM. Foram construídas curvas de calibração registrando a razão de área do analito/área do padrão interno, no intervalo de 0,50 a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Cada ponto da curva corresponde ao valor médio obtido a partir de, no mínimo, três medidas de áreas independentes.

Os extratos foram cromatografados de acordo com as condições estabelecidas na Tabela XI.

O limite de detecção (LD) foi calculado pelo uso de três vezes o desvio padrão do coeficiente linear dividido pelo coeficiente angular, enquanto que o limite de quantificação (LQ) foi calculado pelo uso de 10 vezes o desvio padrão do coeficiente linear dividido pelo coeficiente angular<sup>95</sup>.

Para avaliação da precisão através do cálculo do % RSD utilizou-se uma mistura padrão (DMN, MEN, DEN, DPN, NMOR, NPIR, NPIP e DBN) a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  que foi injetada 11 vezes.

**Tabela XI:** Condições cromatográficas aplicadas aos extratos analisados

condição		GC/FID	GC/FID	GC/MSD	
coluna		HP-1	DB-5	HP-1	CARBOWAX 20M
condições de aquecimento da coluna	T <sub>inicial</sub>	35 °C	40 °C	35 °C	35 °C
	t <sub>inicial</sub>	3 min	2 min	3 min	3 min
	vel <sub>aquec</sub> (1)	5 °C min <sup>-1</sup>	5 °C min <sup>-1</sup>	5 °C min <sup>-1</sup>	5 °C min <sup>-1</sup>
	T <sub>final</sub> (1)	70 °C	75 °C	70 °C	70 °C
	vel <sub>aquec</sub> (2)	15 °C min <sup>-1</sup>	15 °C min <sup>-1</sup>	15 °C min <sup>-1</sup>	15 °C min <sup>-1</sup>
	T <sub>final</sub> (2)	200 °C	225 °C	200 °C	200 °C
	t <sub>final</sub> (min.)	10 min	5 min	10 min	10 min
Temperatura do injetor		200 °C	200 °C	150 °C	150 °C
Temperatura do detector		250 °C	250 °C	250 °C	200 °C
gás de arraste (fluxo)		H <sub>2</sub> (1 mL min <sup>-1</sup> )		He (1 mL min <sup>-1</sup> )	
modo de injeção		splitless	splitless	split (1:20)	
volume injetado		1,0 µL	1,0 µL	1,5 µL	
modo de ionização			-----	impacto eletrônico com 70 eV	
íons analisados (modo SIM)			-----	m/e = 74, 88, 100, 102, 114, 116, 130, 154, 158	

### 3.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO MEKC

#### 3.5.1 PREPARO E CONDICIONAMENTO DO CAPILAR

O capilar de sílica fundida (50 cm x 75 µm) foi construído conforme as indicações do equipamento. O novo capilar (antes do primeiro uso) foi submetido a um ciclo de lavagens padrão com HCl 1 mol L<sup>-1</sup> por 5 min, seguido de NaOH 0,1 Mol L<sup>-1</sup> por 10 min e com água ultrapura por 5 min.

Para o trabalho, o capilar foi condicionado diariamente por passagem de água ultrapura (5 min) seguido de uma solução recentemente preparada de NaOH 0,1 Mol L<sup>-1</sup> (5 min), água ultrapura (5 min) e tampão recentemente preparado (20 min). Tanto o tampão como o NaOH, foram filtrados com filtro de nylon (0,45 µm).

Após as análises, o capilar foi enxaguado com água ultrapura (5 min) e passou-se uma corrente de N<sub>2</sub> para retirar os resíduos do tampão antes da estocagem.

### 3.5.2 OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS QUÍMICAS

#### 3.5.2.1 O TAMPÃO

Os primeiros experimentos foram conduzidos com o tampão e as condições instrumentais utilizados por Ng e colaboradores<sup>115</sup>. A Tabela XII apresenta um paralelo entre condições utilizadas por Ng e colaboradores e as condições iniciais utilizadas neste trabalho. A grande diferença é que neste trabalho foram utilizados um equipamento comercial e apenas o capilar de sílica sem nenhum recobrimento em seu interior.

#### 3.5.2.2 VARIÁVEIS ESTUDADAS

As variáveis estudadas foram: pH (de 4,0 a 6,6), concentração de SDS (de 40 a 80 mMol L<sup>-1</sup>) e concentração de  $\gamma$ -CD (de 0 – sem adição de CD – a 20 mMol L<sup>-1</sup>). A Tabela XIII apresenta a constituição dos diferentes tampões estudados. Os tampões foram preparados por dissolução de reagente com água ultrapura em banho de ultra-som. O pH foi corrigido com ácido fosfórico.

Para desenvolvimento da metodologia foram preparadas amostras aquosas sintéticas. Previamente a cada amostra eram analisados dois brancos. O primeiro corresponde à água MILIQ e o segundo com água MILIQ + 5 % de metanol. Esta quantidade de metanol é igual a existente em uma solução de trabalho a 10 mg L<sup>-1</sup> obtida pela diluição (a 10 mL) de 100  $\mu$ L de cada solução estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> (estocada em metanol). O pico para cada analito foi identificado pela combinação dos resultados obtidos a partir de análises de misturas e de soluções individuais dos padrões, com concentrações variáveis de 0,25 mg L<sup>-1</sup> a 40 mg L<sup>-1</sup>.

**Tabela XII:** Comparação entre condições de trabalho para otimização do método eletroforético

	Ng et al	Condições iniciais deste trabalho
tampão	0,05 M fosfato 0,05 Borato	0,05 M fosfato 0,05 Borato
SDS	40 mMol L <sup>-1</sup>	40 mMol L <sup>-1</sup>
γ-CD	10 mMol L <sup>-1</sup>	10 mMol L <sup>-1</sup>
pH	6,6	6,6
equipamento	<i>home made</i>	CE comercial-P/ACE Beckman-5500
tamanho do capilar	50 cm x 75 μm id	50 cm x 75 μm
voltagem	11 KV	11 KV
comprimento de onda	254 nm	236 e 254 nm
injeção	hidrodinâmica por pressão tempo 5s	Hidrodinâmica por pressão tempo 5s
analitos	N-nitrosodietanolamina - NDEA N-nitrosodimetilamina - DMN N-nitrosomorfolina - NMOR	N-nitrosodimetilamina - DMN N-nitrosodietilamina - DEN N-nitrosopiperidina - NPIP N-nitrosopirrolidina -NPIR N-nitrosomorfolina - NMOR N-nitrosodibutilamina - DBN

**Tabela XIII:** Composição dos tampões estudados.

composição	Tampão1	Tampão2	Tampão3	Tampão 4	Tampão 5	Tampão 6
Fosfato	0,05 mol L <sup>-1</sup>	0,05 mol L <sup>-1</sup>	0,05 mol L <sup>-1</sup>	0,05 mol L <sup>-1</sup>	0,05 mol L <sup>-1</sup>	0,05 mol L <sup>-1</sup>
Borato	0,05 mol L <sup>-1</sup>	0,05 mol L <sup>-1</sup>	0,05 mol L <sup>-1</sup>	0,05 mol L <sup>-1</sup>	0,05 mol L <sup>-1</sup>	0,05 mol L <sup>-1</sup>
SDS	0,04 mol L <sup>-1</sup>	0,04 mol L <sup>-1</sup>	0,04 mol L <sup>-1</sup>	0,06 mol L <sup>-1</sup>	0,08 mol L <sup>-1</sup>	0,08 mol L <sup>-1</sup>
γ CD	0,01 mol L <sup>-1</sup>	0,01 mol L <sup>-1</sup>	0,0	0,0	0,0	0,0
pH	6,6	4,0	6,6	6,6	6,6	5,0

### 3.5.3 OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS INSTRUMENTAIS

Uma vez otimizadas as condições do tampão, os parâmetros instrumentais foram estudados com o objetivo de obter uma melhor resolução, sensibilidade e

mais baixos limites de detecção. Com auxílio de soluções aquosas sintéticas – soluções de trabalho – de 2 a 20 mg L<sup>-1</sup> foram estudados:

- Voltagem para separação: 5, 10, 20 kV

- Modos de injeção:

Hidrodinâmica por pressão (5 s, 10 s)

Eletrocínética: tempo de injeção (5, 7, 10, 15, 20, 30 s)

voltagem de injeção (5, 10, 15, 20 kV)

- Comprimento de onda para detecção espectrofotométrica (254 - 236 nm)

### **3.5.4 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO MEKC**

Para avaliar o método eletroforético otimizado, foram construídas curvas de calibração no intervalo de 0,25 a 10 mg L<sup>-1</sup>. Cada ponto da curva corresponde ao valor médio obtido a partir de três medidas de áreas independentes. A análise de uma mistura padrão aquosa (DMN, DEN, NMOR, NPIR, NPIP) a 2 mg L<sup>-1</sup> foi repetida onze vezes, para estudo da precisão do método para cada composto.

Para avaliar a exatidão foram preparadas 4 amostras sintéticas aquosas reunindo diferentes grupos e concentrações de nitrosaminas. Cada uma foi analisada no mínimo, em triplicata.

### **3.5.5 ANÁLISE QUALITATIVA POR MEKC**

A identificação dos compostos foi feita considerando os tempos de migração de cada analito, em conjunto com a comparação entre eletroferogramas para amostras que sofreram a adição de padrões e que não sofreram esta adição. Também foi considerada a comparação entre os espectros UV-vis dos picos dos possíveis compostos e espectros obtidos a partir dos padrões puros foi considerada.

### **3.6 EXTRAÇÃO DAS NITROSAMINAS A PARTIR DE AMOSTRAS REAIS**

Os baixos níveis nos quais as nitrosaminas ocorrem em alimentos e a natureza heterogênea destes, faz com que sejam necessárias várias etapas tais como isolamento, *clean up* e pré-concentração, até atingir a detecção e quantificação.

Neste trabalho foi usada a extração a vácuo por arraste de vapor. O procedimento foi adaptado a partir do método descrito por Telling et al<sup>52</sup>. Neste processo 150 g da amostra (massa da salsicha ou líquido de conserva) congelada foram desintegradas, no caso de amostras sólidas, e misturados com 100 mL de água bidestilada, 25 g de cloreto de sódio e 5 g de carbonato de potássio deixando em repouso por minutos 10 min. Após este tempo a suspensão foi transferida para um balão de fundo redondo o qual foi conectado ao evaporador rotatório para a destilação. O máximo vácuo foi aplicado com o auxílio de uma bomba rotatória e o banho maria aquecido a 65 °C. O condensador foi resfriado com água (4 °C) e o destilado recolhido em frasco de 500 mL em banho de gelo. Estas condições foram mantidas aproximadamente por 60 a 90 min, até que nenhum destilado fosse produzido,. O destilado aquoso produzido foi mantido abaixo de 0 °C, no escuro, por no máximo uma semana<sup>50</sup>.

### **3.7 EXTRAÇÃO, PRÉ-CONCENTRAÇÃO E CLEAN UP DAS NITROSAMINAS A PARTIR DE AMOSTRAS AQUOSAS**

#### **3.7.1 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO**

O procedimento foi adaptado da extração líquido líquido utilizada por Fine et al<sup>116</sup> e Drescher e Frank<sup>41</sup> para extração e pré-concentração de nitrosaminas a partir de amostras líquidas. Um volume de 25,0 mL de amostras sintéticas de nitrosaminas a 400, 800 e 1200 µg L<sup>-1</sup> foi agitado com três porções de 25 mL de DCM. Estas foram reunidas, secas com 10 g de sulfato de sódio anidro, concentradas sob fluxo de nitrogênio em banho de gelo e seu volume corrigido para 1 mL. Foram extraídos

volumes adicionais ( $V'$ ) de DCM, que receberam o mesmo tratamento, para verificar se a extração havia sido completa. Cada porção recebeu padrão interno (bifenila) na concentração de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Os extratos foram cromatografados no sistema GC/FID.

Os destilados aquosos obtidos no rotavapor a partir de amostras reais também foram extraídos pelo mesmo procedimento, recebendo  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de padrão interno e cromatografados no sistema GC/MSD. Os procedimentos foram acompanhados, em paralelo, pela análise de brancos com água bidestilada .

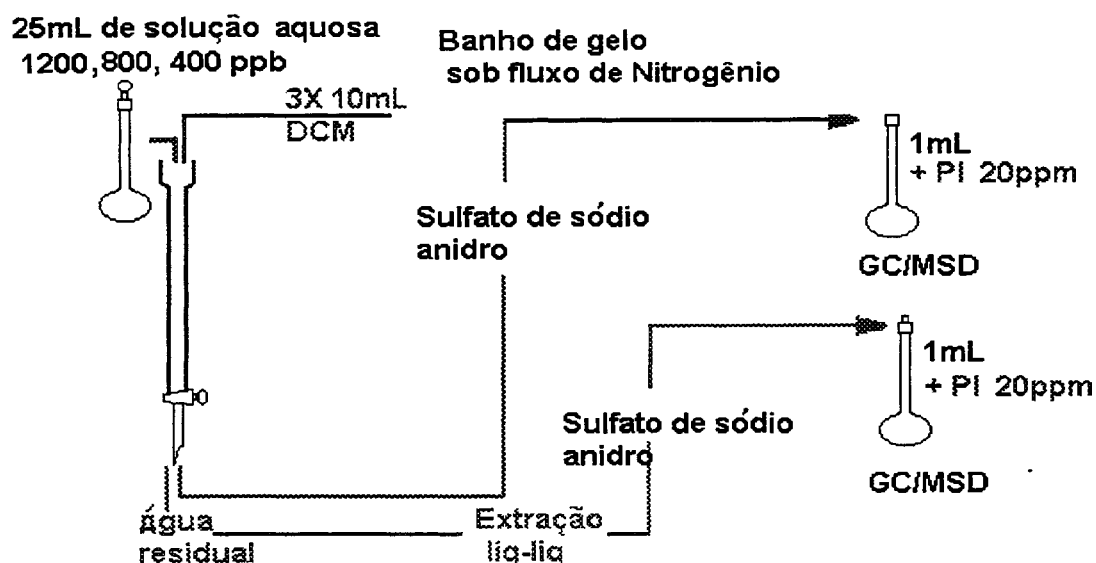
### **3.7.2 SPE USANDO RESINA AMBERLYST XAD-4™**

O procedimento baseou-se no método desenvolvido por Pizzolato e colaboradores<sup>81-84</sup>. Neste processo, 1 g da resina XAD-4™ foi condicionada com água bidestilada e disposta em uma coluna de vidro ( $25 \text{ cm} \times 1,1 \text{ cm}$ ). Foram estudadas, soluções de 400, 800 e  $1200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  em um volume de 25 mL. A representação geral do procedimento experimental adotado está na Figura 19.

Os eluatos foram concentrados sob fluxo de nitrogênio em banho de gelo, separadamente, tendo seus volumes corrigidos a 1 mL e recebendo o padrão interno na concentração de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ .

A água residual foi submetida ao processo de extração líquido-líquido sendo os extratos reunidos e concentrados sob fluxo de nitrogênio em banho de gelo recebendo o mesmo tratamento dos eluatos. Os procedimentos foram acompanhados, em paralelo, pela análise de brancos em água bidestilada .

Os destilados aquosos obtidos no rotavapor a partir de amostras reais também foram submetidos ao mesmo procedimento, recebendo  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de padrão interno e cromatografados no sistema GC/MSD.



**Figura 19:** Representação pictórica da pré-concentração das nitrosaminas usando SPE com resina XAD-4<sup>TM</sup>

### 3.7.2.1.1 ANÁLISE DO LÍQUIDO DE CONSERVA BRUTO E DESTILADO (AMOSTRA A)

150 g do líquido de conserva bruto e 150 g do destilado obtido a partir deste líquido de conserva receberam, cada um separadamente 100 mL de água bidestilada e foram percoladas através da resina XAD-4 conforme procedimento descrito no item 3.7.2.

### 3.7.3 SPE USANDO CARVÃO ATIVO

#### 3.7.3.1 PROCESSO DE SPE EM BATELADA COM CARVÃO ATIVO EM PÓ

##### 3.7.3.1.1 AVALIAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Para a determinação do melhor tempo de adsorção foram usados 25 mL uma mistura padrão aquosa a  $800 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo testados os tempos de 15, 30 e 45 minutos, com 0,5 g de carvão ativo. Para o tempo de 15 minutos de extração



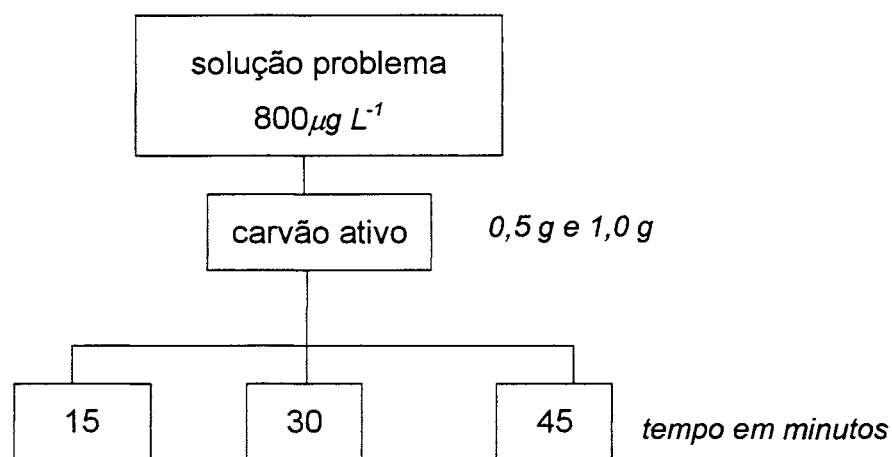
aumentou-se a massa de carvão ativo para 1 g a fim de verificar a influência da quantidade de adsorvente no procedimento.

Durante o desenvolvimento do processo o carvão foi separado por filtração em papel de filtro qualitativo, previamente extraído (em Soxhlet com DCM por 8 horas) sendo a solução aquosa residual submetida a uma nova extração com carvão ativo, a fim de verificar a possibilidade de ainda permanecer algum composto na solução aquosa remanescente.

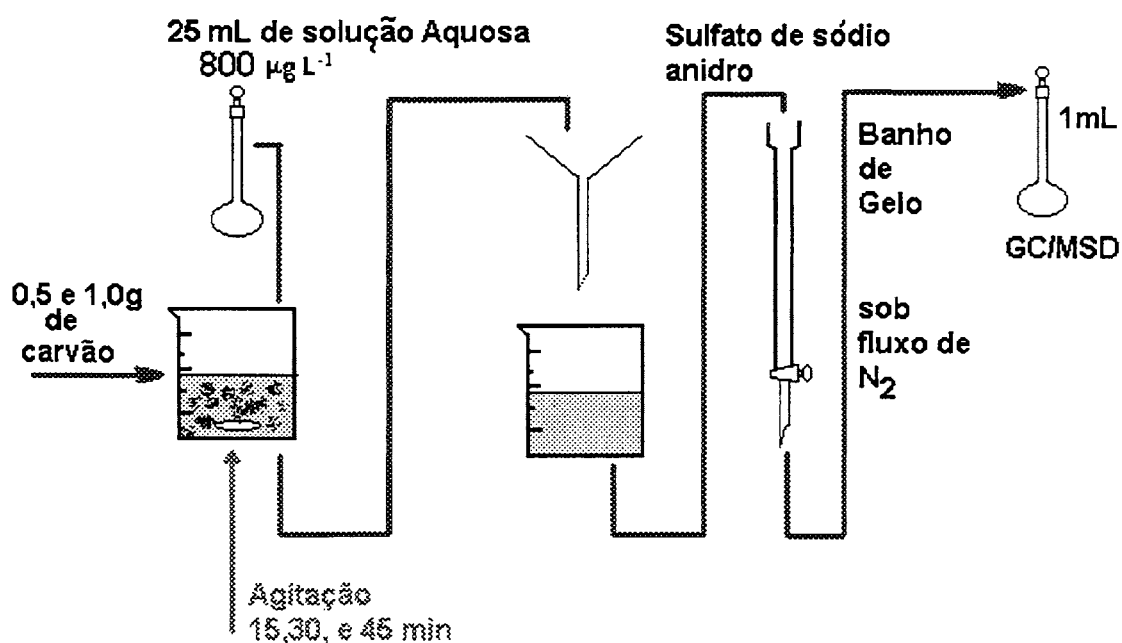
Os analitos foram eluídos com acetona e diclorometano (10 mL de cada um, respectivamente). Usou-se ainda um volume adicional de DCM ( $V' = 10$  mL) para confirmar se todos os compostos haviam sido retirados na eluição anterior. Os extratos, após secagem em coluna com 6 g de sulfato de sódio anidro, foram concentrados a 1 mL sob fluxo de  $N_2$  e em banho de gelo e cromatografados (GC/FID). Todo procedimento foi acompanhado por análise concomitante de brancos, usando água bidestilada. A Figura 20 apresenta um esquema geral do procedimento e a Figura 21 apresenta, de forma pictórica, o processo laboratorial envolvido.

### **Processo Otimizado**

200 mL de uma amostra aquosa foram mantidas sob agitação magnética por 45 min com 1 g de carvão ativo em pó. Após a separação os compostos foram dessorvidos com 10 mL de acetona e 10 mL de DCM e concentrados sob fluxo de nitrogênio (ultra puro) em banho de gelo, sendo seu volume corrigido a 1 mL e adicionado o padrão interno na concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . Estes extratos foram cromatografados (GC/FID, GC/MSD). Todas as análises foram feitas no mínimo em triplicata.



**Figura 20:** Esquema geral usado para o desenvolvimento da metodologia de SPE com carvão ativo



**Figura 21:** Representação pictórica da pré-concentração das nitrosaminas usando SPE com carvão ativo

### 3.7.3.1.2 AVALIAÇÃO POR MEKC

O uso da MEKC permite estudar de forma direta soluções aquosas o que possibilita o controle das águas residuais dos processos de pré-concentração.

Para a determinação das melhores condições de análise foram testados os tempos de adsorção de 15, 30 e 45 minutos, a massa de carvão de 0,5 g a 1,0 g, o volume de amostra aquosa de 25, 100 e 200 mL e a faixa de concentração de 10 a 800  $\mu\text{g L}^{-1}$  dos compostos padrão.

O processo foi desenvolvido da mesma forma como está descrito no item 3.7.3.1., sendo que alguns experimentos foram repetidos para confirmar resultados obtidos por GC-FID.

25 mL de amostras sintéticas aquosas (contendo DMN, DEN, NMOR, NPIR e NPIP nas concentrações de 400 e 800  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foram mantidos sob agitação magnética por 45 minutos com 1,0 e 0,5 g de adsorvente, sendo analisados o eluato e a água residual. O sistema de eluição foi o mesmo otimizado no item 3.7.3.1. A diferença reside no fato que os solventes (DCM e acetona) são totalmente substituídos, após a redução de volume, por água MILIQ enquanto o volume é corrigido para 5 mL. O tempo de agitação foi estudado pela pré-concentração de 25 mL de uma mistura sintética aquosa com 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,5 g de carvão ativo.

Para confirmação dos resultados de massa de adsorvente e tempo de agitação para um faixa de concentração mais baixa, 200 mL de uma mistura sintética aquosa marcada com 10  $\mu\text{g}$  de cada nitrosamina foram mantidas sob agitação para os tempos de 30 e 45 minutos com 0,5 e 1,0 g de carvão ativo em pó.

O procedimento otimizado ao final coincide com o apresentado no item 3.7.3.1.

### **3.7.3.1.2.1 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO ELETROFORÉTICO USANDO SPE COM CARVÃO ATIVO EM PÓ**

Curvas de calibração foram construídas no intervalo de 50 a 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  para caracterizar o método eletroforético combinado com os processos de pré-concentração otimizados. Cada ponto da curva corresponde ao valor médio obtido a partir de três medidas de áreas independentes. O limite de detecção (LD) foi calculado pelo uso de três vezes o desvio padrão do coeficiente linear dividido pelo coeficiente angular, enquanto que o limite de quantificação foi calculado pelo uso de 10 vezes o desvio padrão do coeficiente linear dividido pelo coeficiente angular<sup>95</sup>.

A exatidão do processo de pré - concentração foi estudada pela análise de amostras sintéticas aquosas.

Estudos de recuperação foram desenvolvidos a partir de amostras sintéticas aquosas em intervalos de 50 a 800  $\mu\text{g L}^{-1}$

Para avaliar o efeito dos demais componentes da matriz sobre a recuperação 150 g do líquido de conserva fortificado com 1000 mg  $\text{kg}^{-1}$  e 150 g da massa da salsicha (B), adicionados de 15  $\mu\text{g}$  (100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), foram destiladas por arraste de vapor conforme procedimento descrito no item 3.6.

Os extratos aquosos foram submetidos ao processo de SPE por carvão em pó (item 3.7.3.1) .

### **3.7.3.2 PROCESSO DE SPE EM COLUNA COM CARVÃO ATIVO GRANULAR**

Com objetivo de simplificar as operações de laboratório, bem como reduzir o tempo de análise e a exposição do analista, foram conduzidos experimentos utilizando carvão granular. Pela sua granulometria pode-se trabalhar com SPE em leito fixo. Este procedimento foi inicialmente avaliado através de MEKC, e posteriormente, por GC.

### 3.7.3.2.1 AVALIAÇÃO POR MEKC

Para a determinação das melhores condições de análise foram testadas as vazões (fluxo da amostra através da coluna) de 1,5 mL min<sup>-1</sup>, 2,5 mL min<sup>-1</sup>, e 5 mL min<sup>-1</sup>. Também se testou o volume de amostra aquosa de 25, 100 e 200 mL, a faixa de concentração de 10 a 800 µg L<sup>-1</sup> dos compostos padrões e a massa de carvão de 1,0 g.

Para otimização das variáveis foram utilizadas amostras sintéticas aquosas obtidas pela diluição das soluções estoque a 1000 mg L<sup>-1</sup> de DMN, DEN, NMOR, NPIP, NPIR

#### **Processo Otimizado**

O procedimento otimizado consistiu em agitar 1 g de carvão ativo granular por 10 min com 20 mL de água MILIQ e empacotar uma coluna de vidro (20 cm X 11 mm) com esta mistura. O excesso de água foi retirado. Através desta coluna diferentes volumes (25, 100, 200 mL) de amostras sintéticas aquosas em diferentes concentrações foram percoladas. A eluição dos compostos a partir do adsorvente foi feita por eluição com 10 mL de acetona, 10 mL de DCM e um volume adicional de 10 mL de DCM. As frações foram concentradas sob fluxo de nitrogênio N<sub>2</sub> em banho de gelo. Os volumes foram corrigidos para 5 mL em água ultrapura, para análise por MEKC.

#### **3.7.3.2.1.1 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO ELETROFORÉTICO USANDO SPE COM CARVÃO ATIVO GRANULAR**

O procedimento MEKC foi caracterizado da mesma forma como está descrito no item 3.7.3.1.2.1, com duas principais diferenças, quais sejam a faixas de concentração usadas para a construção das curvas de calibração (10 a 200 µg L<sup>-1</sup>) e para os estudos de recuperação (50 a 1000 µg L<sup>-1</sup>).

### 3.7.3.2.2 AVALIAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Para análises por cromatografia gasosa (detecção FID e MSD) os extratos foram secos em colunas com 5 g de sulfato de sódio anidro e seus volumes corrigidos a 1 mL com DCM recebendo 2 mg L<sup>-1</sup> de bifenila como padrão interno. Todas as análises foram pelo menos em triplicata.

Em função dos resultados obtidos via SPE-MEKC com carvão granular, estudos adicionais foram desenvolvidos avaliando o procedimento via GC-FID e GC-MSD. As condições utilizadas foram as mesmas descritas no item 3.4.

#### 3.7.3.2.2.1 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO GC-FID USANDO SPE COM CARVÃO GRANULAR

As curvas de calibração foram construídas no intervalo de 10 a 200 µg L<sup>-1</sup>. Cada ponto da curva corresponde ao valor médio obtido a partir de três medidas de áreas independentes. Os limites de detecção (LD) e quantificação foram calculados conforme o item 3.4.

Com objetivo de avaliar a exatidão do método, 200 mL de uma mistura sintética aquosa com diferentes concentrações e 200 mL de um padrão 50 µg L<sup>-1</sup> foram submetidas ao procedimento de SPE com carvão granular. Para cálculo do resultado foi usado o fator de calibração calculado a partir deste padrão.

Estudos de recuperação foram desenvolvidos a partir de 200 mL de amostras sintéticas aquosas em intervalos de 50 a 1000 µg L<sup>-1</sup> para carvão granular.

Para avaliar o efeito dos demais componentes da matriz 150 g do líquido de conserva marcado com 0,2 mg kg<sup>-1</sup> e 150 g da massa da salsicha (A), adicionada de 30 µg dos padrões DMN, DEN, NMOR, NPIR, NPIP e DBN (200 µg kg<sup>-1</sup>), foram destiladas por arraste de vapor conforme procedimento descrito no item 3.6.

Os destilados aquosos foram submetidos ao processo de SPE por carvão granular (item 3.7.3.4.2).

### 3.7.3.5 APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO DESENVOLVIDO A AMOSTRAS REAIS

Nesta etapa do trabalho aplicou-se a melhor metodologia analítica encontrada à análise das amostras usando os dois procedimentos de extração com carvão ativo. O procedimento final pode ser abreviado como **SPE/CA/GC/FID/MSD**, significando *EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA com CARVÃO ATIVO (granular e em pó) com os extratos sendo analisados por CROMATOGRAFIA GASOSA com DETECTOR POR IONIZAÇÃO DE CHAMA e DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS*. Foi realizada a análise qualitativa com o auxílio da biblioteca de espectros de massas e de alguns padrões, e análise quantitativa.

Uma vez definidos e caracterizados os processos para pré-concentração e análise, estes foram aplicados às amostras reais (salsichas enlatadas).

Cada lata de salsicha teve seu conteúdo separado, sendo a salsicha representando a amostra sólida e o líquido de conserva representando as amostras líquidas.

As amostras aquosas líquidas foram tratadas de duas formas:

- pré-concentração de maneira direta, sem qualquer tratamento anterior, e
- pré-concentração a partir do destilado aquoso obtido por destilação a vácuo com arraste de vapor.

As amostras sólidas foram destiladas por arraste de vapor, sendo analisada a porção arrastada.

#### 3.7.3.5.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS LÍQUIDAS

150 g da amostra (líquido de conserva ou destilado aquoso do líquido de conserva) acrescida de 100 mL de água bidestilada foram submetidos ao processo de SPE em batelada usando carvão ativo em pó (item 3.7.3.1.) e granular (item.3.7.3.2). Todas as análises foram realizadas, no mínimo, em triplicata.

### 3.7.3.5.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS SÓLIDAS

150 g das amostras sólidas (massa de salsichas enlatadas desintegradas manualmente), acrescidas de 100 mL de água bidestilada foram submetidos ao processo de arraste de vapor, sendo o destilado aquoso, posteriormente, submetido à extração em fase sólida com carvão ativo, conforme os itens 3.7.3.1 e 3.7.3.2.

### 3.7.3.5.3 ANÁLISE QUALITATIVA

A identificação dos compostos foi obtida por comparação dos tempos de retenção dos analitos contidos nas misturas padrão e os picos obtidos a partir de amostras reais. Acrescentou-se o estudo dos espectros de massas e a observação do incremento da área dos picos suspeitos, quando se trabalhou com amostras fortificadas.

### 3.7.3.5.4 ANÁLISE QUANTITATIVA

A análise quantitativa foi realizada usando-se a combinação do método do padrão interno e método de adição de padrão único. Admite-se que para faixa de concentração em que as nitrosaminas ocorrem nas amostras estudadas, o processo de SPE com carvão ativo apresenta uma relação linear entre concentração da amostra e o sinal gerado nos equipamentos de análise. Para cálculo da concentração dos analitos utiliza-se um fator de calibração calculado a partir de uma mistura padrão analisada em paralelo com os extratos obtidos a partir das amostras marcadas e não marcadas. Considerando portanto, a recuperação dos compostos, calcula-se um fator de correção baseado no método da adição de padrão. Desta forma chega-se ao valor mais próximo da *concentração real*.



Cálculo do fator de calibração:

$$F_{\text{Cal}} = \frac{\text{concentração do composto no padrão}}{\text{Área relativa do composto no padrão}}$$

Cálculo do fator de correção:

$$F_{\text{Cor}} = \frac{100}{\% \text{ de recuperação média do analito}}$$

$$\text{Concentração real} = F_{\text{Cal}} \times \text{área relativa do composto na amostra} \times F_{\text{Cor}}$$

Os limites de detecção foram calculados para amostras de 150 g de amostras de salsicha, considerando como sinal mínimo detectável, três vezes o sinal do ruído.

## ***4 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS***

---

### **4.1 ANÁLISE INSTRUMENTAL DE NITROSAMINAS: GC E MEKC**

Os resultados apresentados e discutidos nesta etapa referem-se ao uso de soluções de trabalho contendo as nitrosaminas padrões.

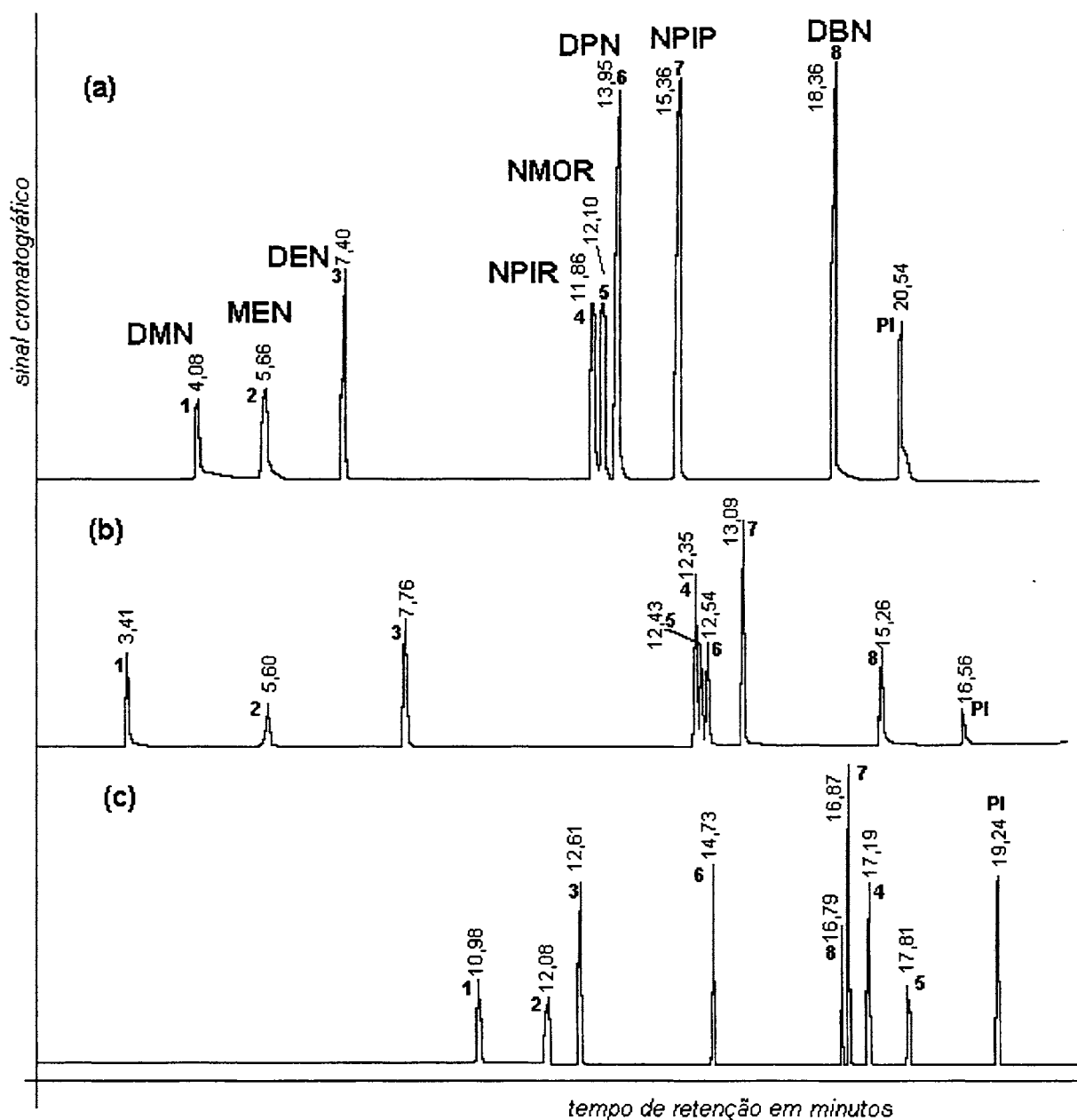
#### **4.1.1 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA: OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE**

A Figura 22 apresenta os cromatogramas obtidos via GC/FID e GC/MSD para a mistura de padrões, nas condições apresentadas na Tabela XI. A Tabela XIV identifica os picos assinalados na Figura 22, além de indicar os íons usados na identificação e caracterização destes compostos pelo modo SIM.

Os melhores resultados em termos de separação foram obtidos com a coluna Carbowax 20M e DB5, observa-se um aumento no tempo de retenção dos

compostos na coluna Carbowax 20M e inversão no posicionamento de alguns picos.

Os compostos mais polares como a NPIR (pico 4) e NMOR (pico 5) sofreram maior retenção, enquanto que a DBN (pico 8) e a DPN (pico 6) eluíram antes.



**Figura 22:** Cromatogramas da mistura padrão (a) GC/FID com coluna DB-5, (b) GC/MSD com coluna HP-1 e (c) GC/MSD com coluna Carbowax 20M  
 Condições cromatográficas descritas na Tabela XI, página 58

**Tabela XIV:** Identificação dos compostos assinalados na Figura 22 e dos íons utilizados no monitoramento via GC/MSD

pico	composto	íon	pico	composto	íon
1	N-dimetilnitrosamina - DMN	74	5	N-nitrosomorfolina - NMOR	116
2	N-metiletilnitrosamina - MEN	88	6	N-di-n-propilnitrosamina - DPN	130
3	N-dietilnitrosamina - DEN	102	7	N-nitrosopiperidina - NPIP	114
4	N-nitrosopirrolidina - NPIR	100	8	N-di-n-butilnitrosamina - DBN	158
			9	Bifenila - PI	154

#### 4.1.1.1 LINEARIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO PARA O SISTEMA GC/FID

Na Tabela XV estão registrados os parâmetros relativos às equações das retas obtidas para a variação da área relativa (AR) de cada composto de acordo com a variação na concentração. As respectivas retas estão apresentadas no Anexo I. Pela análise destes dados percebe-se que a resposta do detector é perfeitamente linear na faixa de concentração estudada, com fatores de correlação (r) variando de 0,971 a 0,996.

**Tabela XV:** Parâmetros de caracterização do método GC/FID, usando coluna DB-5

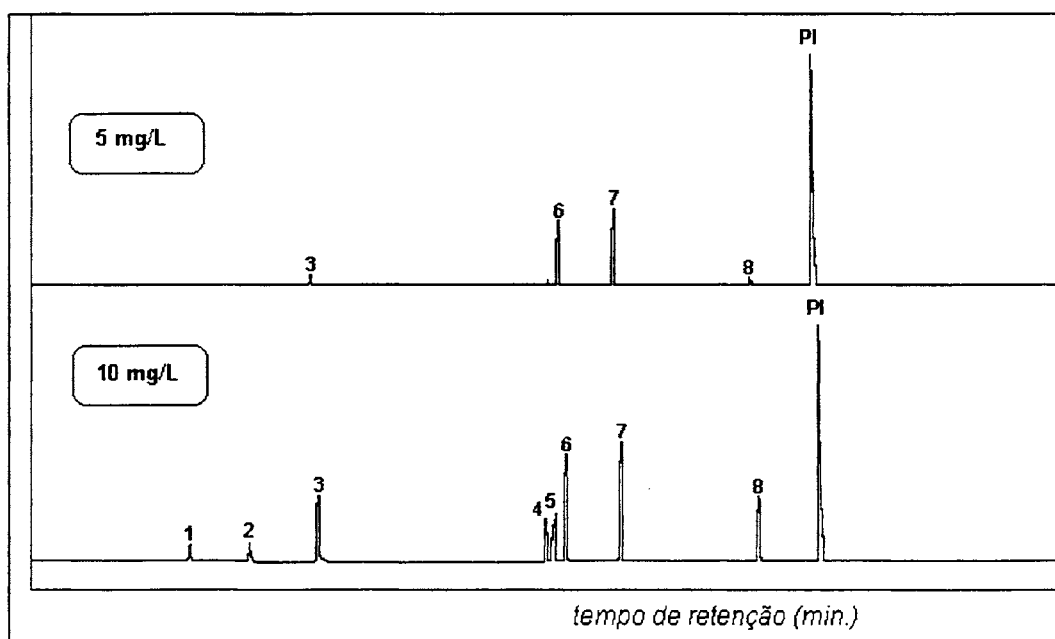
Composto	Equação da reta Y= bx + a		r	LD	LQ	%RSD
	a	b				
DMN	- 0,147±0,033	0,019	0,979	3,6	12,0	9,7
MEN	- 0,463±0,048	0,059	0,996	2,4	8,1	14,3
DEN	- 0,486±0,120	0,095	0,971	3,8	12,6	2,9
NPIR	- 0,458±0,130	0,068	0,996	5,6	18,8	2,1
NMOR	- 0,406±0,090	0,063	0,983	4,1	13,7	6,9
DPN	- 0,015±0,090	0,079	0,982	4,0	13,6	7,2
NPIP	- 0,400±0,100	0,058	0,992	5,3	17,6	1,2
DBN	- 0,367±0,100	0,097	0,993	5,0	16,6	1,5

a: coeficiente linear; b: coeficiente angular; r: coeficiente de correlação; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação (LD e LQ em mg L<sup>-1</sup>); % RSD: desvio padrão relativo percentual

O LD variou entre 2,4 e 5,6 mg L<sup>-1</sup>, valores elevados para análise de nitrosaminas indicando a necessidade de uma etapa de pré-concentração.

O LD pode ser melhor visualizado na Figura 23, que apresenta os cromatogramas obtidos para soluções padrão nas concentrações de 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>. Os picos com maior sinal (6 e 7) pertencem aos compostos DPN e NPIP.

Observe-se que, na prática, os compostos DPN e NPIP têm *limites de integração* bem inferiores a 5 mg L<sup>-1</sup>, pois os picos apresentados na Figura 23 apresentam áreas consideravelmente maiores do que os demais picos.



**Figura 23:** Cromatogramas (GC/FID com coluna DB-5) para a mistura de padrões nas concentrações de 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>

*Condições cromatográficas descritas na Tabela XI, página 58*

#### 4.1.1.2 LINEARIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO PARA O SISTEMA GC/MSD

As soluções a 0,5, 1, 3, 5, 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>, todas com 2 mg L<sup>-1</sup> de Padrão Interno, foram cromatografadas no sistema GC/MSD. A construção da curva de calibração para o intervalo de 0,5 a 10 mg L<sup>-1</sup> permitiu através da regressão linear definir as equações das retas que relacionam a área relativa e a concentração para

cada analito. Na Tabela XVI estão registrados os parâmetros relativos à equação da reta obtida para a variação da Área Relativa com a concentração. As respectivas retas estão apresentadas no Anexo II. Pela análise destes dados percebe-se que a resposta do detector é perfeitamente linear na faixa de concentração estudada, com fatores de correlação (r) variando de 0,991 a 0,995.

**Tabela XVI:** Principais parâmetros relativos ao método GC/MSD\*

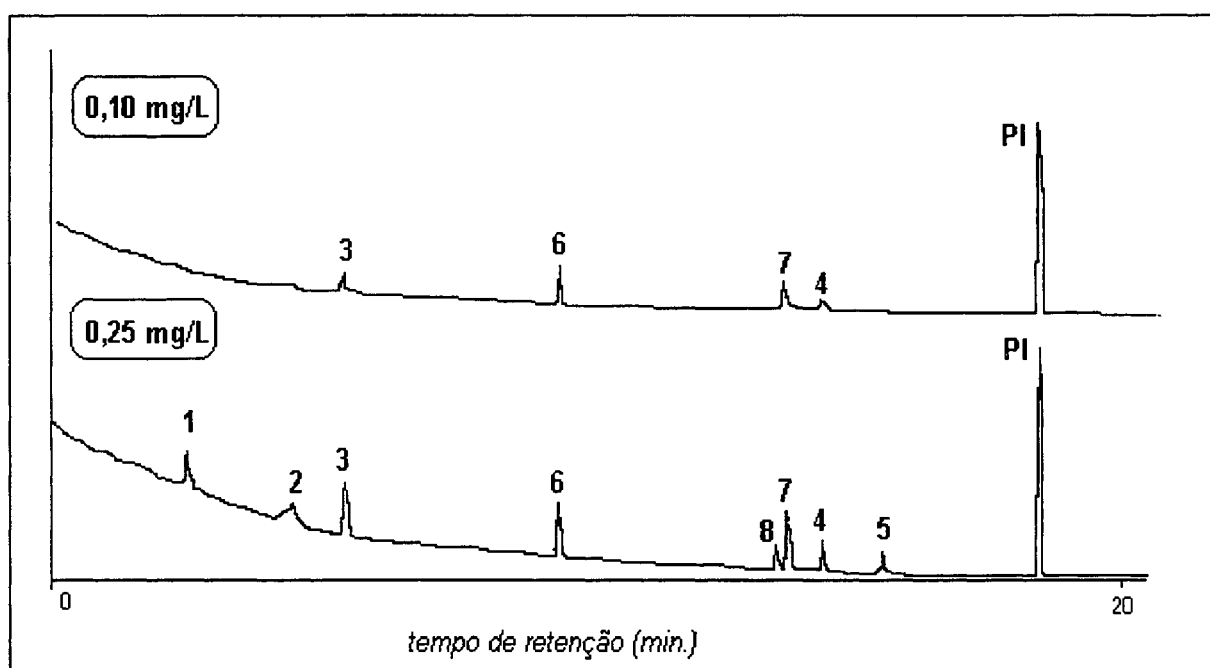
Analitos	Equação	r	R <sup>2</sup>	S <sub>y/x</sub>	LD	LQ	RSD %
DMN	a=-0,021±0,021 b=0,128±4,1.10 <sup>-3</sup>	0,994	98,8	0,0542	530	1760	1,9
MEN	a=-0,054±0,024 b=0,128±4,8.10 <sup>-3</sup>	0,993	97,1	0,061	559	2480	2,9
DEN	a=-0,034±0,035 b=0,188±6,8.10 <sup>-3</sup>	0,993	98,5	0,090	564	1880	2,5
DPN	a=-0,070±0,030 b=0,105±5,6.10 <sup>-3</sup>	0,992	96,4	0,074	857	2857	2,6
DBN	a=-0,021±5,5.10 <sup>-3</sup> b=0,10±1,04.10 <sup>-3</sup>	0,995	99,1	0,013	164,4	532	2,9
NPIR	a=-0,19±0,079 b=0,28±0,015	0,981	96	0,204	846,4	2780	2,6
NMOR	a=-0,03±0,015 b=0,09±3,0.10 <sup>-3</sup>	0,993	98,7	0,103	500	1666	1,0
NPIP	a=-0,17±0,04 b=0,21±7,76.10 <sup>-3</sup>	0,991	98,3	0,0401	571	1904	2,9

\*Para coluna Carbowax 20 M e injeção Split 1:20

a: coeficiente linear; b: coeficiente angular; r: coeficiente de correlação; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação (LD e LQ em µg L<sup>-1</sup>); R<sup>2</sup>: grau de semelhança; S<sub>y/x</sub>: desvio padrão dos resíduos, RSD: % desvio padrão relativo percentual

Observa-se que as análises por GC/MSD no modo SIM apresentam maior seletividade e sensibilidade com limites de detecção mais baixos variando entre 164, e 857  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Menores valores de LD podem ser atingidos usando-se a injeção *Splitless*, conforme mostra a Figura 24, a qual apresenta os cromatogramas obtidos para a solução padrão nas concentrações de 0,25 e 0,10  $\text{mg L}^{-1}$ . Porém o modo splitless leva a saturação do filamento, logo as análises posteriores foram desenvolvidas em modo Split 1:20. O pico com maior sinal (6) corresponde ao composto DPN, o qual também apresenta maior fator de resposta no detector de ionização de chama.

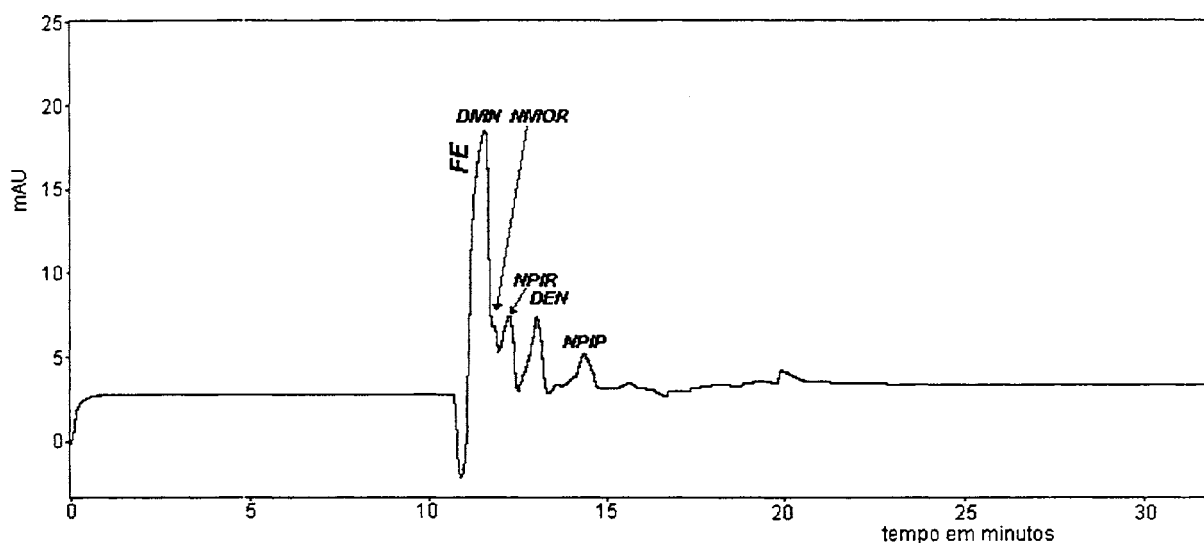


**Figura 24:** Cromatogramas do Íon Total (GC/MSD com Coluna Carbowax 20M) para a mistura de padrões nas concentrações de 0,25 e 0,10  $\text{mg L}^{-1}$   
Condições cromatográficas descritas na Tabela XI, página 58

#### 4.1.2 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA CAPILAR ELETROCINÉTICA MICELAR: OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE

A aplicação direta das condições utilizadas por Ng e colaboradores<sup>115</sup>, tampão e variáveis instrumentais, para a separação de nitrosaminas levou a

eletroferogramas com picos alargados e mal resolvidos, com os compostos DMN e NMOR migrando junto com o fluxo eletrosmótico (FE), conforme pode ser observado na Figura 25.



**Figura 25:** Eletroferograma para mistura padrão na concentração de  $20 \text{ mg L}^{-1}$   
Condições descritas na Tabela XII, página 60

#### 4.1.2.1 OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS QUÍMICAS

A Tabela XVII apresenta as variações nos tempos de migração e correntes geradas a partir dos diferentes tampões utilizados durante a otimização das variáveis químicas.

A aplicação do tampão 1 não produziu a separação dos compostos, levando a picos alargados e sobrepostos com alguns compostos migrando junto com o fluxo eletrosmótico. Isto é claramente observado na Figura 25 que apresenta um eletroferograma de uma mistura sintética na concentração de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ .



**Tabela XVII:** Tempos de migração e correntes geradas para diferentes tampões

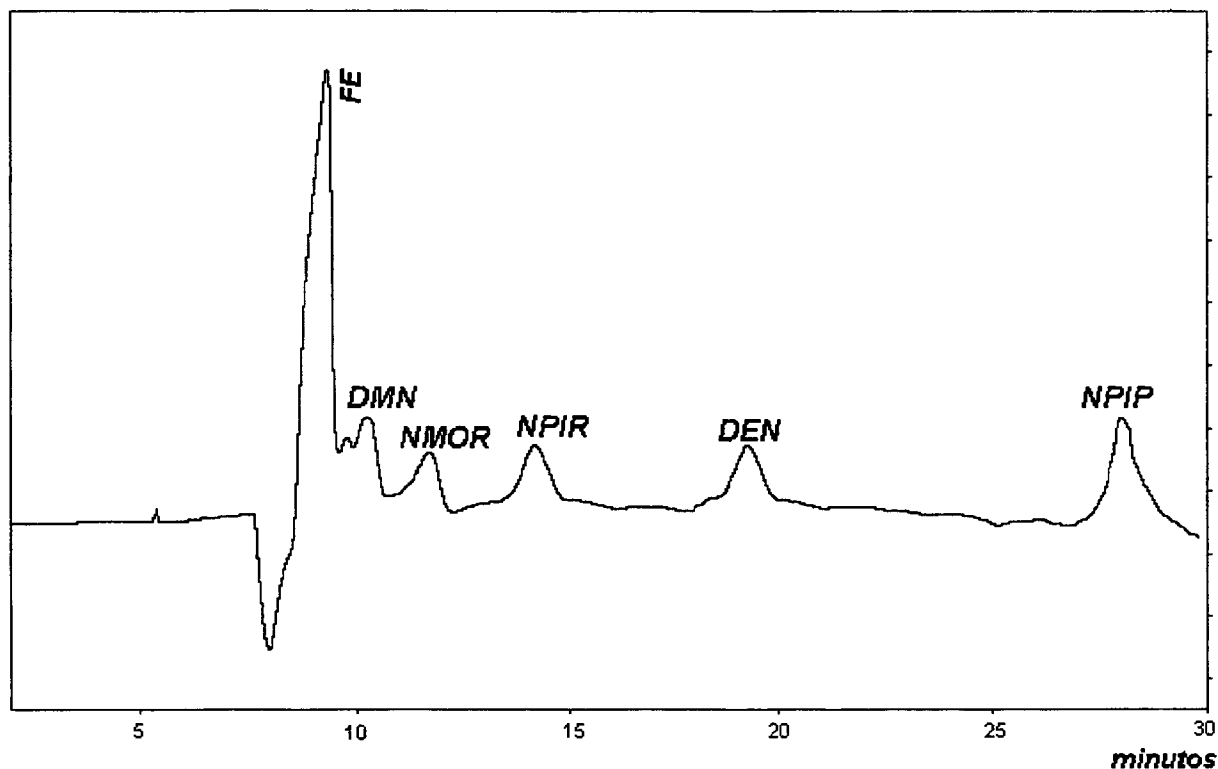
analitos	T1	RSD%	T2	RSD%	T3	RSD%	T4	RSD%	T5	RSD%	T6	RSD%
Fluxo	11,580	3,5	19,386	4,6	8,530	3,1	9,390	4,1	9,28	3,9	22,531	6,2
DMN	nd	--	19,742	6,4	8,958	2,1	9,497	2,9	9,614	3,2	23,124	5,1
NMOR	11,585	3,5	20,283	5,5	9,154	4,5	9,860	3,6	10,184	4,1	23,875	3,3
NPIR	12,285	3,7	20,777	5,7	9,509	1,9	10,584	2,8	11,316	2,9	24,982	4,9
DEN	13,085	5,1	23,381	5,1	10,256	3,7	12,141	3,9	13,529	1,7	27,143	5,8
NPIP	14,419	4,7	28,056	6,3	11,701	2,8	14,496	3,6	17,076	5,3	31,088	6,9
Cor	90 $\mu$ A	5,1	95 $\mu$ A	3,2	95 $\mu$ A	1,2	80 $\mu$ A	1,7	70 $\mu$ A	3,8	83,6 $\mu$ A	3,3

T: Tampão; Cor: Corrente gerada durante a separação eletroforética para soluções a 10 mg L<sup>-1</sup>

#### 4.1.2.1.1 pH

Significativas mudanças na velocidade do fluxo eletroosmótico podem ser obtidas pela alteração do pH do tampão, sendo inclusive descrito na bibliografia que certos tampões com pHs inferiores a 3,0 eliminam totalmente o fluxo eletroosmótico. O fluxo eletroosmótico é determinado em grande parte pela carga da superfície da parede do capilar. Esta carga, conforme discutido no item 2.6.2.1.2 induz a formação da dupla camada elétrica. Conseqüentemente valores mais baixos de pH fazem com que os grupos silanóis permaneçam não ionizados, reduzindo a carga negativa destes grupamentos.

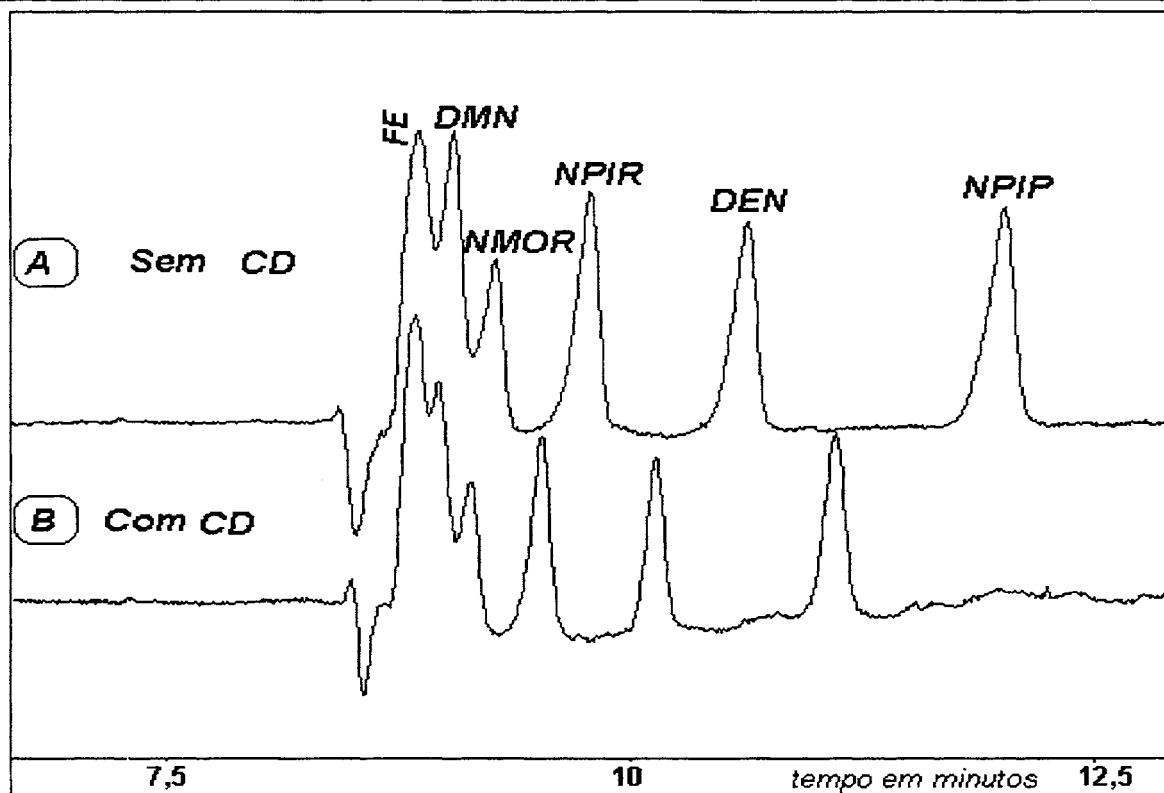
Portanto no tampão 2 o pH foi reduzido para 4,0 e como pode ser visto na Figura 26, ocorre uma importante melhora na resolução dos compostos às custas de um excessivo tempo de análise e alargamento dos picos. A partir daí, manteve-se o pH em 6,6 enquanto outras variáveis foram otimizadas. No tampão 6 o pH foi reduzido para 5,0 mas o ganho em resolução não compensou o grande tempo de análise. Desta forma, o pH do tampão selecionado foi 6,6.



**Figura 26:** Eletroferograma da mistura padrão a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  em pH 4,0  
Condições: Voltagem de separação: 10 kV; tampão 2, injeção hidrodinâmica 5 s

#### 4.1.2.1.2 $\gamma$ CICLODEXTRINA (CD)

Este composto tem sido convencionalmente utilizado como seletor quiral e para facilitar a migração dos compostos de baixa polaridade com fraca solubilidade no tampão. Como muitos dos compostos estudados apresentavam-se migrando junto ao fluxo eletroosmótico, a retirada da CD (tampão 3) melhorou a resolução, favorecendo a separação dos compostos, aumentando seu tempo de migração. Pode-se observar na Figura 27 a melhora da resolução para os compostos DMN e NMOR que permanecem ainda como “ombros” nos eletroferogramas. Os compostos com maior tempo de migração como NPIP, DEN e NPIR encontram-se perfeitamente resolvidos.

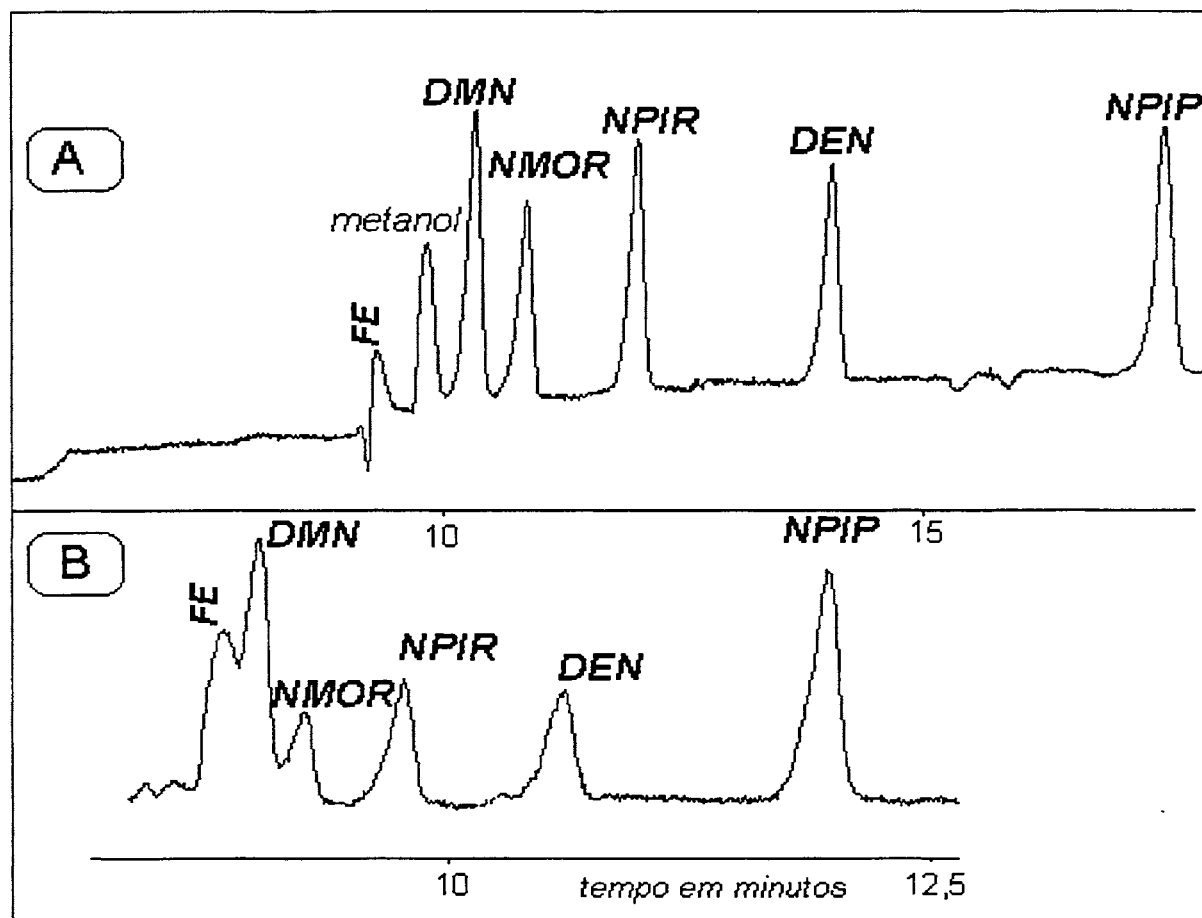


**Figura 27:** Comparação entre eletroferogramas obtidos a partir de uma mistura padrão  $20 \text{ mg L}^{-1}$  com e sem adição de CD

Condições: Injeção eletrocínética por 10s - 10kV; e voltagem de separação 10kV

#### 4.1.2.1.3 DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS)

O surfactante SDS, sendo o formador das micelas, representa um aspecto chave na eficiência de separação em MEKC. Para melhorar a separação dos compostos que ainda permanecem com uma velocidade de migração muito alta, a quantidade de SDS foi aumentada para  $60 \text{ mmolL}^{-1}$  no tampão 4 e  $80 \text{ mmolL}^{-1}$  no tampão 5. A concentração otimizada foi de  $80 \text{ mmolL}^{-1}$ . Isto faz com que ocorra um aumento do fator de capacidade induzindo a uma maior interação dos compostos com a pseudofase estacionária (SDS), aumentando os tempos de migração, melhorando a resolução entre os compostos DMN, NMOR e o fluxo eletroosmótico. A Figura 28 apresenta a melhora da separação em função do aumento da concentração de SDS, através da comparação dos eletroferogramas obtidos usando os tampões 3 ( $40 \text{ mmolL}^{-1}$  de SDS) e 5 ( $80 \text{ mmolL}^{-1}$  de SDS).



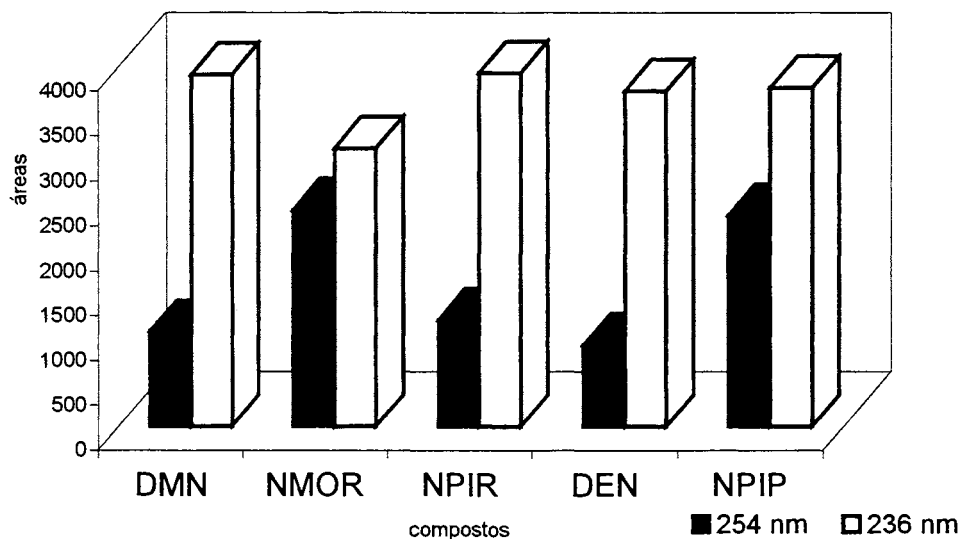
**Figura 28:** Eletroferogramas da mistura padrão com diferentes valores de concentração de SDS (A)  $80 \text{ mmolL}^{-1}$  (tampão 5); (B)  $40 \text{ mmolL}^{-1}$  (tampão 3)  
Condições: Injeção eletrocinética 10 s – 10KV, Padrão  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , Voltagem de separação 10 KV

#### 4.1.2.1 VARIÁVEIS INSTRUMENTAIS

##### 4.1.2.1.1 COMPRIMENTO DE ONDA PARA DETECÇÃO

A partir do estudo dos espectros de absorção molecular na faixa do UV-Vis para cada analito, foi selecionado o comprimento de 236 nm. As leituras neste comprimento de onda levaram a um aumento nas áreas e conseqüentemente melhora nos limites de detecção e na sensibilidade pelo aumento da absorvidade

dos analitos. A Figura 29 mostra a comparação entre as áreas dos picos medidas nos dois comprimentos de onda, 254 e 236 nm.

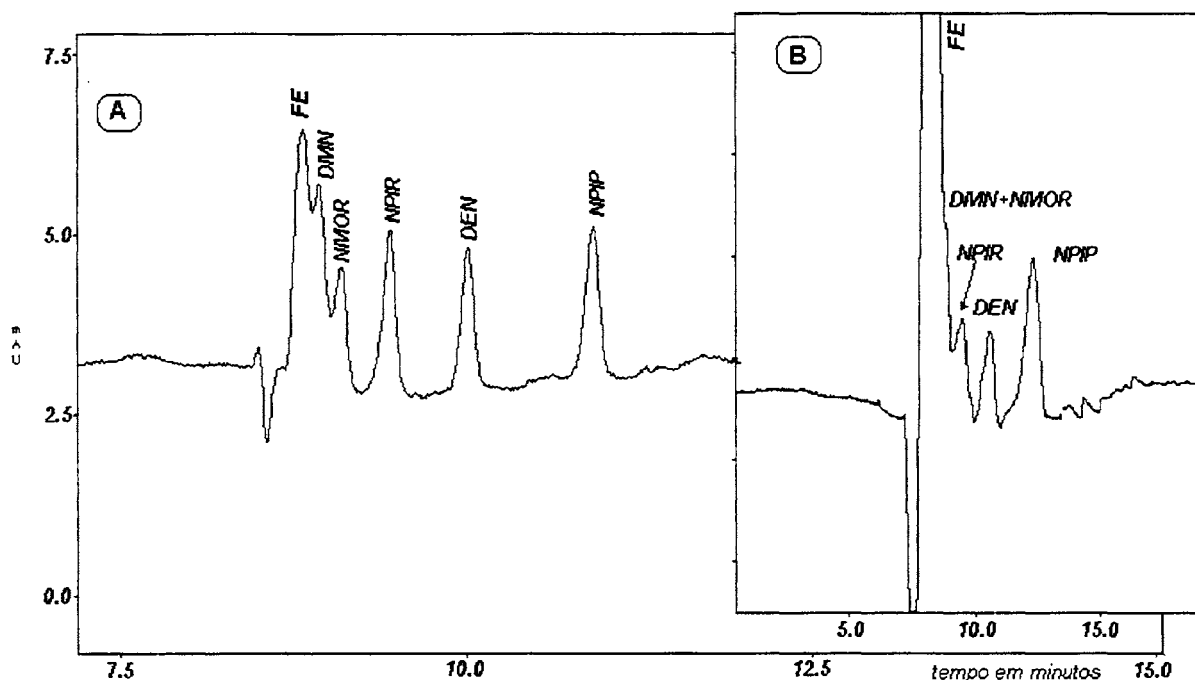


**Figura 29:** Variação da área do pico no eletroferograma com o comprimento de onda para mistura sintética na concentração de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$   
Condições: tampão 5, Injeção eletrocínética 10KV/10 segundos, voltagem de separação 10kV

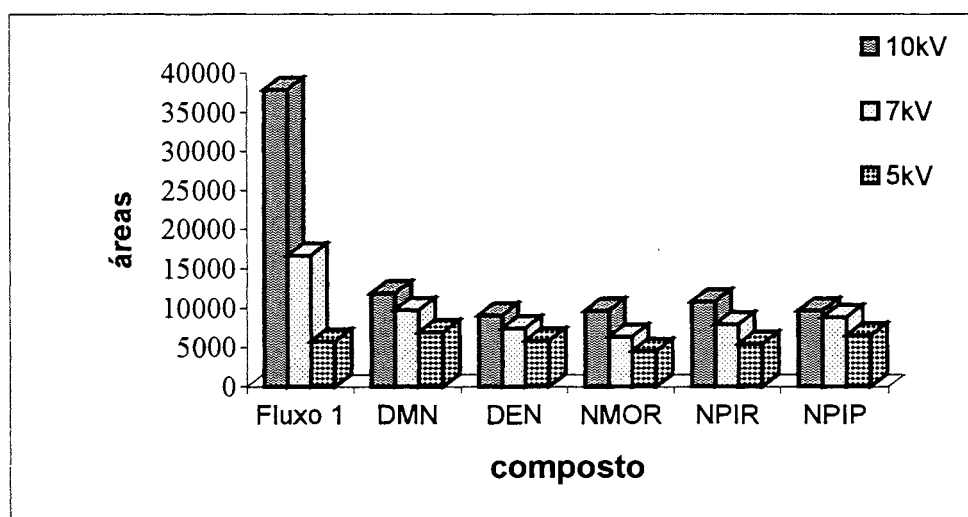
#### 4.1.2.1.2 MODO DE INJEÇÃO

Através do estudo da Figura 30 pode-se observar a comparação entre os dois modos de injeção, hidrodinâmica por pressão e eletrocínética. Embora a injeção hidrodinâmica leve a áreas maiores, a injeção eletrocínética é bastante mais seletiva melhorando a resolução entre os compostos.

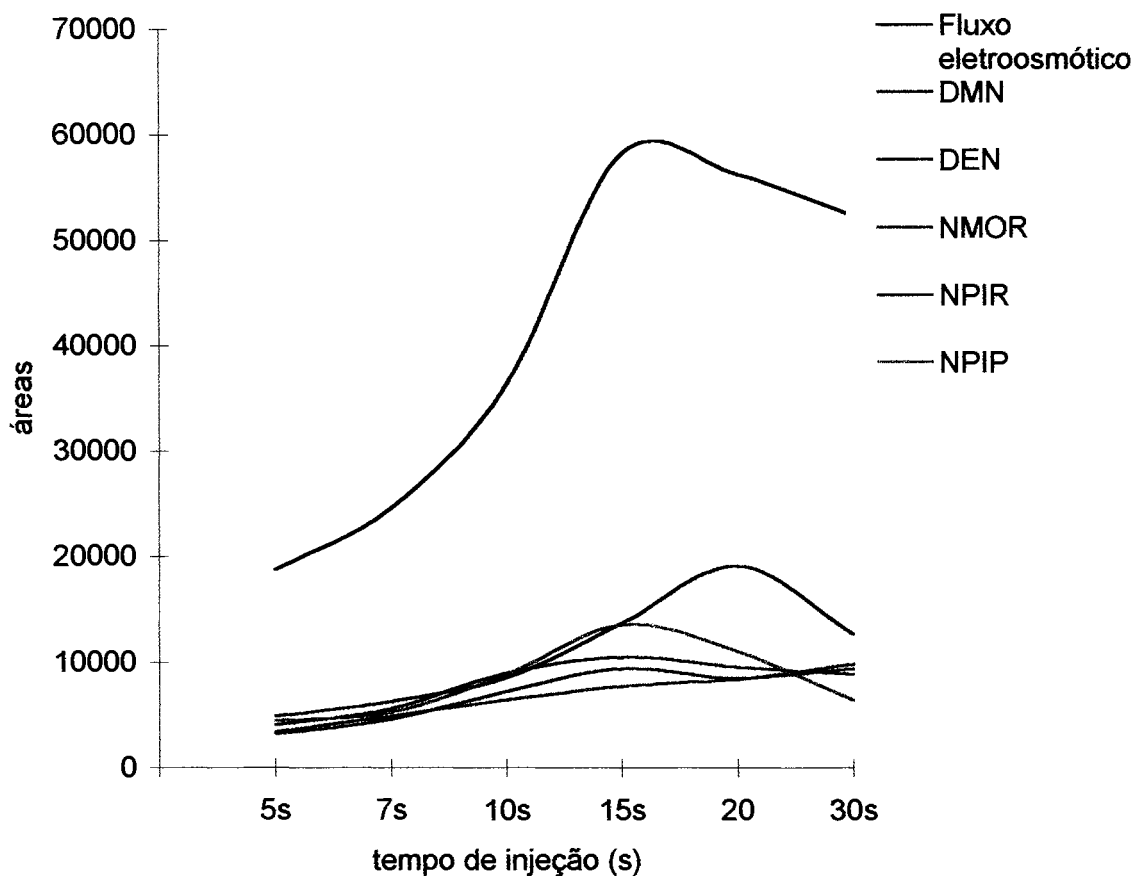
Com a mesma solução ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram feitas análises com diferentes tempos de injeção e voltagem para melhorar a injeção eletrocínética. Os gráficos das Figuras 31 e 32 ilustram o comportamento encontrado. Embora ocorra um aumento significativo nas áreas com aumento do tempo e da voltagem de injeção, a perda da resolução entre os compostos DMN, NMOR e o fluxo eletrosmótico, faz com que o tempo de 10 segundos e 10 kV de voltagem componham o melhor conjunto de condições.



**Figura: 30** Comparação entre os eletroferogramas obtidos com diferentes métodos de injeção: (A) eletrocinética com 10 kV por 10 s e (B) hidrodinâmica por 10 s  
 Condições: tampão 15, voltagem de separação 10 kV, padrão a 20 mg L<sup>-1</sup>



**Figura 31:** Comparação entre as áreas dos picos obtidos no eletroferograma em diferentes voltagens de injeção eletrocinética  
 Condições: Voltagem de separação 10 KV, amostra sintética 2 mg L<sup>-1</sup>; tempo de 5s, Tampão 5

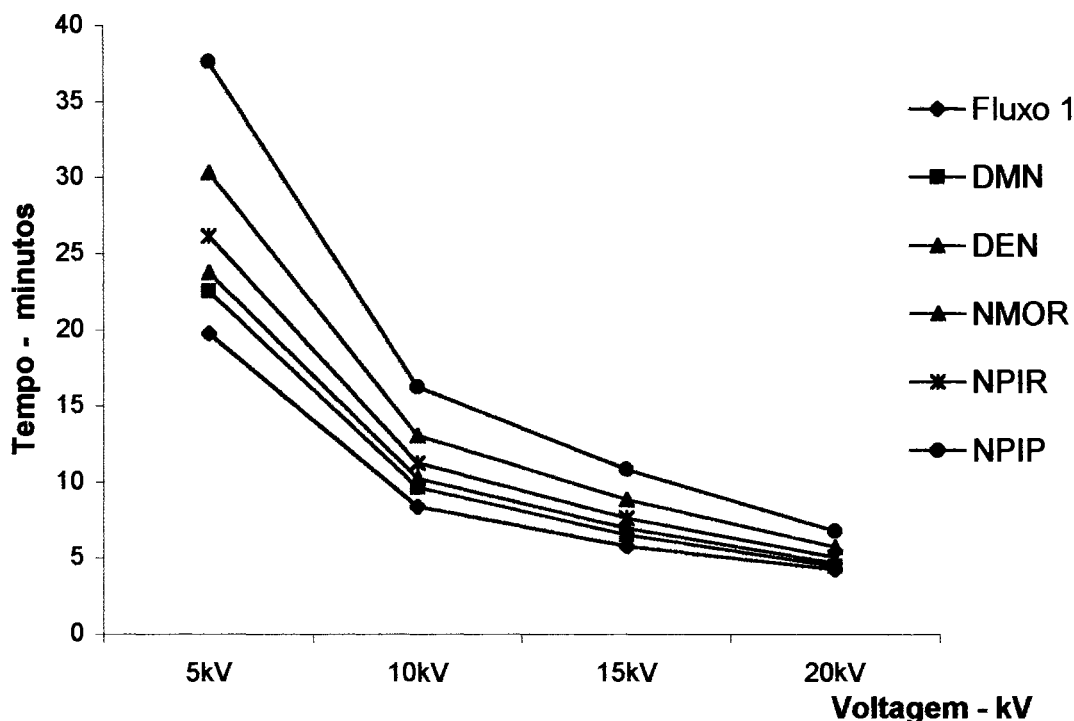


**Figura 32:** Variação das áreas dos picos obtidos no eletroferograma em diferentes tempos de injeção eletrocinética  
 Condições: *voltagem de injeção 10 kV, Tampão 5, Voltagem de separação 10 KV, padrão 2 mg L<sup>-1</sup>*

#### 4.1.2.2.3 VOLTAGEM DE SEPARAÇÃO

Através deste estudo verificou-se que o aumento da voltagem aplicada para separação dos compostos leva a uma redução no tempo de análise acompanhada da perda de resolução. O uso de voltagem mais baixa faz com que o tempo de residência do composto frente ao detector seja maior, isto eleva o valor das áreas melhorando os limites de detecção e sensibilidade, porém favorece a dispersão levando a um alargamento dos picos e conseqüente perda da resolução. Valores

elevados de voltagem também implicam em perda de resolução. Isto está bem claro na Figura 33 onde se observa a convergência das linhas do gráfico para um mesmo valor de tempo, ou seja perda da seletividade do método. A Figura 34 apresenta o ganho nos valores de área com o aumento dos valores de voltagem.

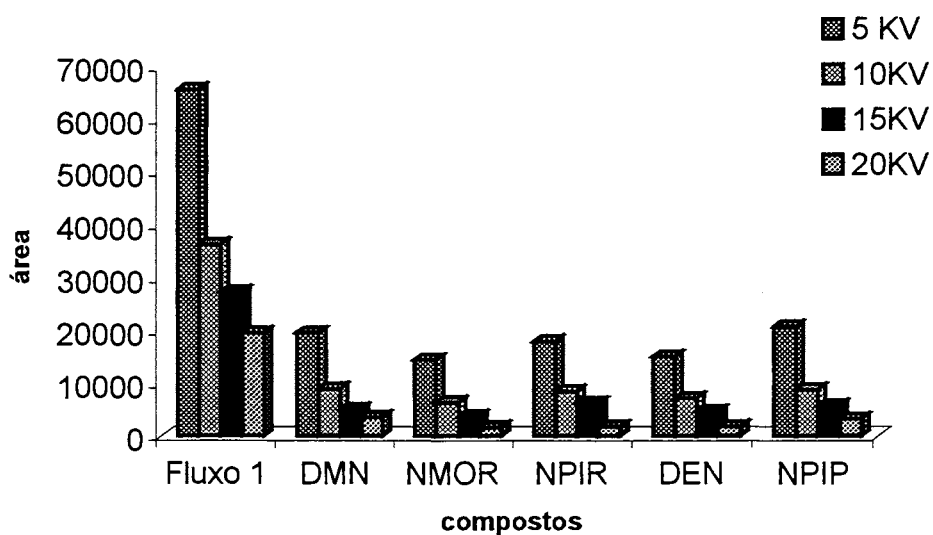


**Figura 33:** Estudo da variação do tempo de migração com a voltagem de separação  
 Condições: *tampão 5, injeção eletrocinética 10kV/10s, amostra sintética 2 mg L<sup>-1</sup>*

O tempo excessivo de análise e a busca de baixos valores de corrente para minimizar o efeito Joule faz com que o valor de 10 kV seja selecionado para análise. Para amostras que contenham apenas compostos com maior tempo de migração como (DEN, NPIP, NMOR, NPIR) pode-se trabalhar em condições de maior tempo e voltagem de injeção e menores voltagens de separação, que produzam melhores limites de detecção, em função de sua excelente resolução.

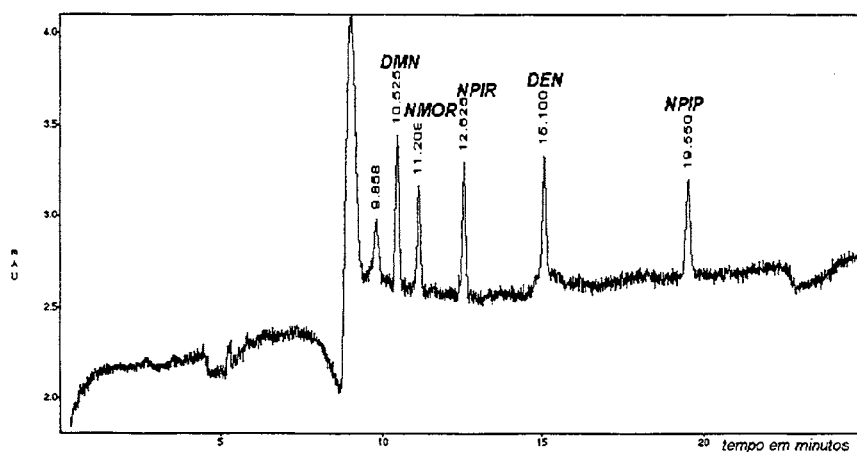
Após a otimização das variáveis instrumentais e químicas foram obtidos eletroferogramas com picos completamente resolvidos para os compostos DMN, NMOR, NPIR, DEN, NPIP conforme mostra a Figura 35.





**Figura 34:** Variação da área dos picos obtidos no eletroferograma com a voltagem de separação

Condições: injeção eletrocinética 10 kV/10 s, tampão 5, amostra sintética 2 mg L<sup>-1</sup>



**Figura 35:** Eletroferograma da mistura padrão a 2 mg L<sup>-1</sup> após otimização das condições

Condições: injeção eletrocinética 10 kV tempo 10 s, voltagem de separação 10 KV, tampão 5 (80 mmolL<sup>-1</sup> de SDS, pH 6,6, 50 mmolL<sup>-1</sup> fosfato/borato e sem CD)

#### 4.1.2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

A identificação dos compostos foi desenvolvida através do estudo de misturas sintéticas em diversas constituições e concentrações apresentadas na Tabela XVIII. A Figura 36 apresenta os eletroferogramas do branco com 5 % de metanol, onde se observa um desdobramento do fluxo eletrosmótico devido à separação do metanol utilizado no preparo das soluções estoques. Também nesta figura tem-se os eletroferogramas das misturas A, B, C e D, cuja composição está na Tabela XVIII.

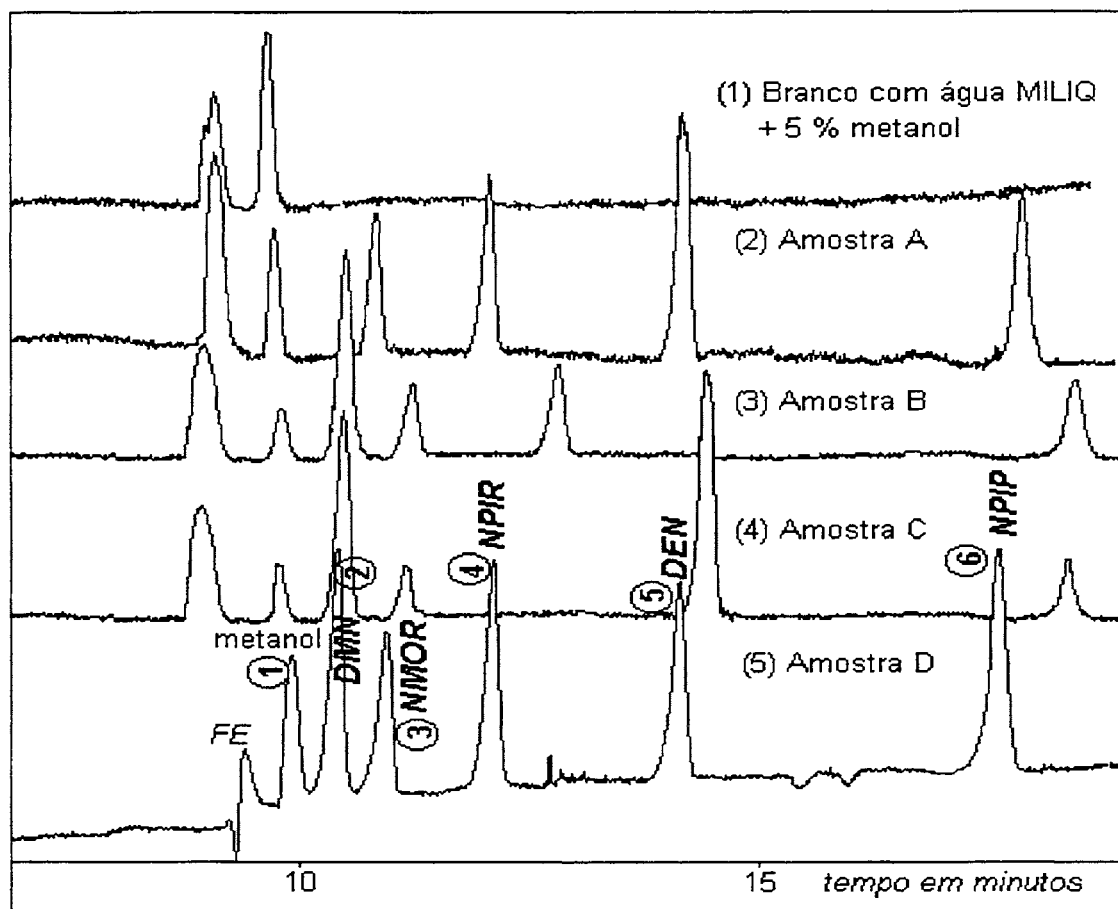
**Tabela XVIII:** Composição das amostras sintéticas usadas na identificação dos picos nos eletroferogramas

compostos	Amostra A			Amostra B			Amostra C			Amostra D		
	conc	área	RSD	conc	área	RSD	conc	área	RSD	conc	área	RSD
DMN	0	----	--	20	37801	2,9	10	28813	3,2	20	43809	3,6
NMOR	10	17854	4,7	10	16073	3,1	5	12174	4,5	20	29156	4,4
NPIR	10	19863	7,1	10	21490	2,9	0	----	--	20	39984	2,0
DEN	20	36456	3,3	0	----	--	30	60859	2,1	20	37180	1,3
NPIP	10	15499	3,0	10	17410	4,3	5	9360	1,7	20	38116	1,9

RSD: Desvio Padrão percentual (%), com: concentração em mg L<sup>-1</sup>

Na mistura sintética A observa-se a ausência do pico 2 referente a DMN. Comparando-se as misturas A e D em relação à presença da DEN (pico 5), verifica-se que ocorre a manutenção do valor de área deste pico, confirmando sua concentração. Já na mistura B colocou-se o composto DMN e retirou-se a DEN e desta forma pode-se observar o aparecimento do pico 2 referente a DMN e o desaparecimento do pico 5. Pode-se verificar que os demais compostos mantêm os valores de área.

Uma confirmação adicional é obtida pela observação dos resultados da análise da amostra C onde desaparece o pico 4 com a retirada da NPIR e ocorre a redução das áreas dos analitos NMOR e NPIP a 5 mg L<sup>-1</sup>. Destaque-se que o aumento da área do pico 5 nesta amostra confirma a concentração da DEN a 30 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 36:** Comparação entre os eletroferogramas para as diferentes amostras sintéticas e um branco

Condições: injeção eletrocinética 10 kV tempo 10 s, voltagem de separação 10 KV, tampão 5 ( $80 \text{ mmolL}^{-1}$  de SDS, pH 6,6,  $50 \text{ mmolL}^{-1}$  fosfato/borato e sem CD)

#### 4.1.2.4 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO ELETROFORÉTICO

A construção de curvas de calibração (área x concentração) em um intervalo de  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo cada ponto correspondente a um valor médio obtido a partir de três medidas independentes, permitiu a determinação dos limites de quantificação e detecção, equações da reta e desvio padrão relativo para cada composto. Estes parâmetros estão apresentados na Tabela XIX.

Os limites de detecção variaram entre  $0,16$  e  $0,27 \text{ mg L}^{-1}$  e os limites de quantificação variaram entre  $0,52$  e  $1,10 \text{ mg L}^{-1}$ . Cabe ressaltar que estes são valores de limites elevados para análise de nitrosaminas, o que confirma a

necessidade de um processo de pré-concentração para que sejam atingidos os limites de detecção e quantificação exigidos para estes analitos. O estudo do desvio padrão relativo percentual (% RSD) para área e para o tempo de migração indica que o método apresenta boa repetibilidade. Outra observação importante refere-se a detecção espectrofotométrica que apresenta maior sensibilidade que os detectores MSD e FID. Este comportamento já havia sido evidenciado em estudos preliminares apresentados no Anexo III.

**Tabela XIX:** Parâmetros de caracterização do método eletroforético

Analitos	Equação $y = bx + a$	r	R <sup>2</sup>	S y/x	LD	LQ	RSD % área(*)	RSD % Tempo(*)
DMN	a=-865,1±236,3 b=4149,5±76,44	0,993	99,4	672,6	0,17	0,57	4,5	3,6
NMOR	a=-213,9±217,3 b=2661,0±45,8	0,995	99,6	695,6	0,24	0,82	5,0	4,1
NPIR	a=315,7±231,1 b=3462,1±48,8	0,995	99,6	739,7	0,20	0,67	4,7	3,9
DEN	a=195,3±149,4 b=2871,0±31,51	0,994	99,8	478,1	0,16	0,52	5,4	2,8
NPIP	a=-684,9±237,4 b=3332,2±50,1	0,997	99,6	759,9	0,21	0,71	6,9	4,6

(\*) n = 11; a: coeficiente linear; b: coeficiente angular; S x/y: desvio padrão dos resíduos; r: coeficiente de correlação linear; R<sup>2</sup>: grau de acoplamento (em %) obtidos pela análise da variância (ANOVA) para validação do método; LD limite de detecção; LQ limite de quantificação (LD e LQ em mg L<sup>-1</sup>) RSD %área: desvio padrão relativo à área; RSD %Tempo: desvio padrão relativo ao tempo de migração

A aplicação do método a amostras sintéticas utilizando as equações apresentadas na Tabela XIX permitiu determinações do erro relativo variando entre 5 a 25%. Este estudo está resumido na Tabela XX. Estes resultados podem ser considerados aceitáveis para análise de nitrosaminas por eletroforese capilar. O método proposto pode ser conseqüentemente utilizado para amostras aquosas nas quais várias das nitrosaminas estudadas possam estar presentes.

**Tabela XX:** Valores de concentração encontrados para diferentes amostras aquosas sintéticas analisadas por MEKC nas condições otimizadas

Amostra sintética	analito	Quantidade adicionada-mg L <sup>-1</sup>	Quantidade encontrada-mg L <sup>-1</sup>	% de erro
1	DMN	0,50	0,50	00
	NMOR	0,50	0,50	00
	NPIR	0,80	0,74	-7,5
	DEN	0,50	0,43	-14,0
	NPIP	0,95	1,00	+5,3
2	DMN	0,30	0,36	+20,0
	NPIR	0,50	0,40	-20,0
	NPIP	0,80	0,81	+1,0
3	DMN	0,80	0,95	+19,0
	NMOR	0,60	0,53	-11,7
	NPIR	0,80	0,70	-12,5
	DEN	1,20	1,49	+24,2
	NPIP	1,60	1,52	-5,0
4	DMN	1,50	1,20	-20,0
	NMOR	2,0	2,50	+25,0
	NPIR	2,00	1,84	-8,0
	NPIP	1,20	1,05	-12,5

*Condições: injeção eletrocínética 10 kV tempo 10 s, voltagem de separação 10 KV, tampão 5 (80 mmolL<sup>-1</sup> de SDS, pH 6,6, 50 mmolL<sup>-1</sup> fosfato/borato e sem CD)*

## 4.2 EXTRAÇÃO DE NITROSAMINAS A PARTIR DE MATRIZES AQUOSAS (PRÉ-CONCENTRAÇÃO E CLEAN UP)

### 4.2.1 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A Tabela XXI apresenta os resultados obtidos para a análise cromatográfica (GC/FID) dos extratos obtidos pela aplicação da extração líquido-líquido (LLE) a soluções padrão aquosas de nitrosaminas nas concentrações de 400, 800 e

1200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os valores apresentados nesta tabela correspondem à média de, pelo menos, três determinações. A partir destes dados pode-se verificar que o processo não é adequado para a extração deste tipo de compostos, apresentando baixa recuperação.

**Tabela XXI:** Valores de área relativa dos picos cromatográficos, desvio padrão percentual e recuperação para os extratos obtidos por LLE de soluções padrão aquosas de nitrosaminas nas concentrações de 400, 800 e 1200  $\mu\text{g L}^{-1}$

compostos	400 $\mu\text{g L}^{-1}$			800 $\mu\text{g L}^{-1}$			1200 $\mu\text{g L}^{-1}$		
	AR	RSD %	REC%	AR	RSD %	REC%	AR	RSD %	REC%
DMN				---	---	---	0,120	9,2	40,4
MEN	0,119	12,0	38,1	0,245	15,5	37,5	0,488	9,8	49,0
DEN	0,601	9,8	58,3	0,479	7,3	49,7	0,823	12,1	36,3
NPIR	0,099	8,1	37,6	0,232	3,4	32,2	0,392	6,1	49,9
NMOR	0,110	5,9	38,9	0,280	4,6	42,0	0,442	3,4	49,6
DPN	0,501	7,3	52,0	0,825	8,7	57,1	1,189	8,7	50,8
NPIP	0,312	9,1	56,0	0,553	8,1	48,0	0,834	4,3	52,5
DBN	0,176	7,3	61,1	0,338	8,3	51,6	0,501	11,2	52,1

AR: área relativa; RSD %: desvio padrão relativo; REC%: % de recuperação  
 Condições cromatográficas descritas na Tabela XI, página 58

Mesmo com resultados indicando que este não é um método adequado para este tipo de amostra, aplicou-se a técnica de LLE a amostras reais. A aplicação da extração líquido – líquido ao destilado aquoso obtido para 150 g de amostras de salsicha A não permitiu a detecção de nenhum analito.

#### 4.2.2 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM AMBERLYST XAD-4™

A Tabela XXII apresenta os resultados obtidos para a análise cromatográfica (GC/FID) dos extratos obtidos pela aplicação da SFE com a Resina Amberlyst XAD-4™ a soluções aquosas padrão nas concentrações de 400, 800 e 1200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os valores apresentados nesta tabela correspondem à média de, pelo menos, três

determinações. A LLE foi aplicada á água residual a fim de verificar se ali permaneciam compostos não retidos pela fase estacionária, os resultados podem ser vistos na Figura 37. Esta figura apresenta uma comparação entre as áreas relativas dos picos cromatográficos dos compostos no extrato de SPE, na água residual e na solução padrão não submetida ao processo de extração, para as três concentrações estudadas (400, 800 e 1200 µg L<sup>-1</sup>).

**Tabela XXII:** Valores de área relativa dos picos cromatográficos, desvio padrão percentual e recuperação para os extratos obtidos por SPE com XAD-4 de soluções padrão aquosas de nitrosaminas nas concentrações de 400, 800 e 1200 µg L<sup>-1</sup>

compostos	400 µg L <sup>-1</sup>			800 µg L <sup>-1</sup>			1200 µg L <sup>-1</sup>		
	AR	RSD %	REC%	AR	RSD %	REC%	AR	RSD %	REC%
DMN	---	---	---	---	---	---	0,067	1,5	20,0
MEN	0,159	6,3	46,5	0,169	6,8	47,9	0,470	7,7	55,1
DEN	0,366	7,2	70,4	0,529	5,1	45,6	1,078	8,6	48,0
NPIR	0,110	8,1	35,0	0,214	5,6	31,8	0,411	19,2	72,5
NMOR	0,114	10,3	36,0	0,250	6,8	36,6	0,376	15,4	79,1
DPN	0,630	12,1	91,0	1,368	3,7	85,5	1,380	10,4	41,0
NPIP	0,391	10,1	81,5	0,889	4,9	75,9	1,500	11,7	49,0
DBN	0,256	9,1	83,5	0,712	2,7	88,4	1,215	12,5	49,5

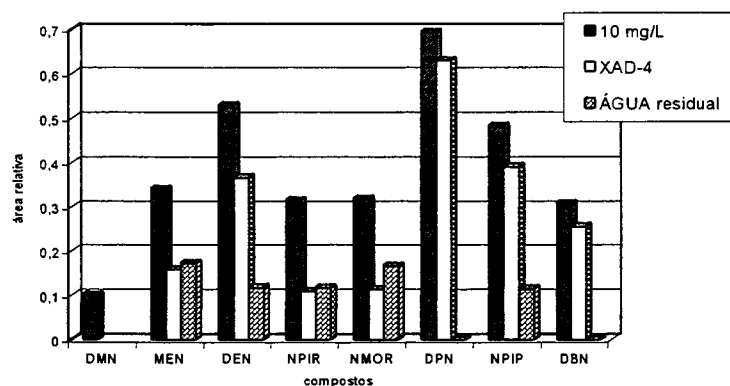
AR: área relativa; RSD %: desvio padrão relativo; REC%: % de recuperação  
 Condições cromatográficas descritas na Tabela XI, página 58

Por outro lado, pode-se afirmar que para os compostos de maior peso molecular, o procedimento com XAD-4 apresenta resultados razoáveis. Provavelmente os compostos mais leves (DMN, DEN, MEN) são arrastados pela água sem ficar retidos.

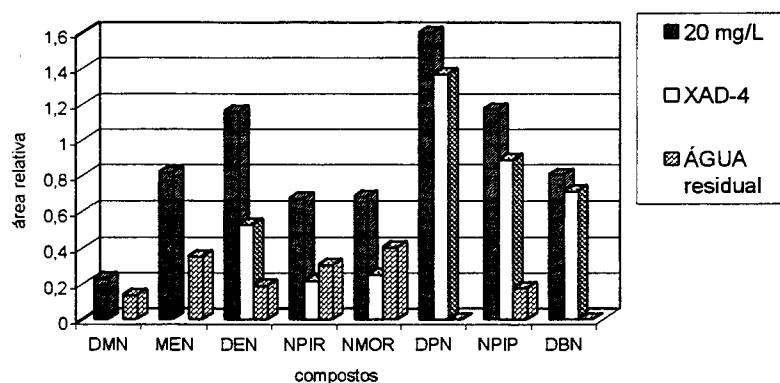
Além disso, também deve ocorrer perda por evaporação durante a redução de volume, pois a recuperação é baixa mesmo na água residual. Cabe ressaltar que o procedimento adotado para a análise da água residual nesta fase foi a LLE a qual, como já foi citado, apresenta baixa recuperação. Isto indica que possivelmente

maiores quantidades de compostos estejam na água residual e não tenham sido extraídos no processo LLE.

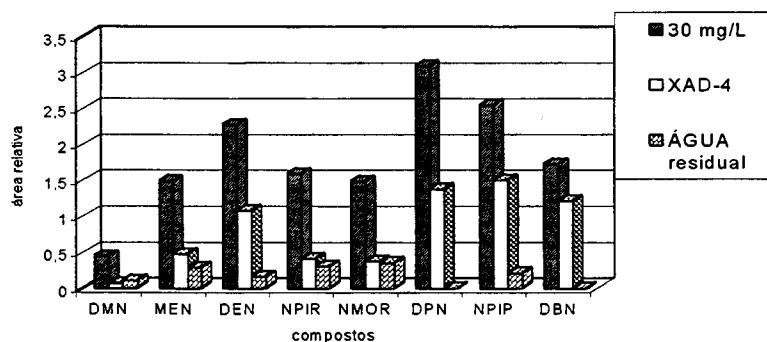
**a) concentração = 400  $\mu\text{g L}^{-1}$**



**b) concentração = 800  $\mu\text{g L}^{-1}$**



**c) concentração = 1200  $\mu\text{g L}^{-1}$**



**Figura 37:** Comparação entre as áreas relativas dos picos cromatográficos dos compostos no extrato de SPE, na água residual e na solução padrão não submetida ao processo de extração, para três concentrações (400, 800 e 1200  $\mu\text{g L}^{-1}$ )  
Condições cromatográficas descritas na Tabela XI, página 58



Outra evidência deste processo é que praticamente nenhum composto sofreu adsorção irreversível na resina XAD-4.

Em resumo, a partir destes dados pode-se verificar que o processo de SPE com resina XAD-4 também não é adequado para a extração dos compostos de maior polaridade. Porém para os compostos NPIP, DEN, DPN, DBN, o uso da resina XAD-4 representa uma alternativa viável.

#### **4.2.2.1 APLICAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM AMBERLYST XAD-4™ À AMOSTRAS REAIS**

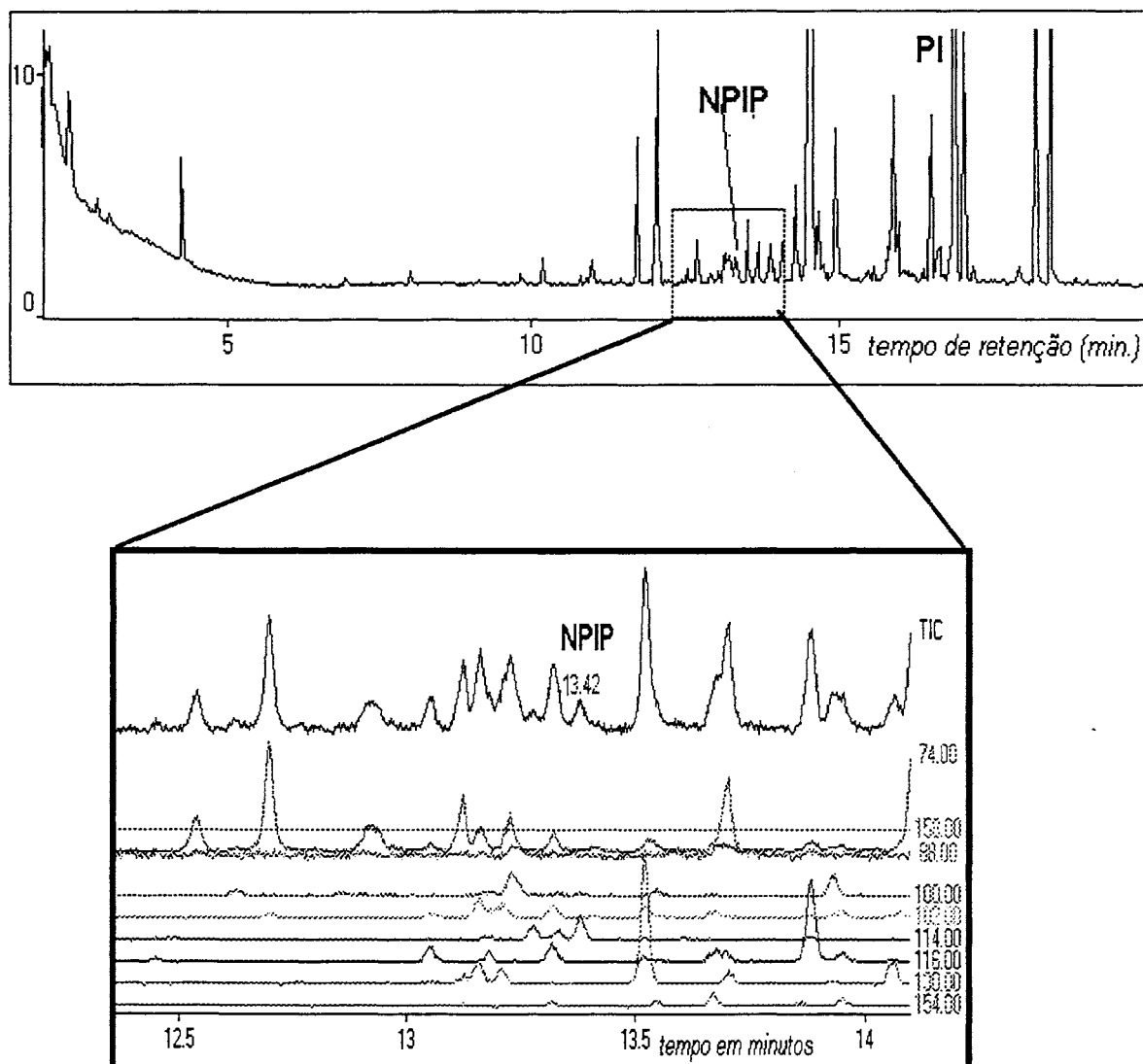
A aplicação da resina XAD 4 aos destilados aquosos da massa de salsicha A (marca brasileira), obtidos pelo procedimento descrito no item 3.6, permitiu a detecção do composto NPIP, porém observa-se a presença de um maior número de picos, provavelmente referentes a compostos lipídicos, conforme pode ser observado na Figura 38.

A análise do líquido de conserva A sem destilação não apresentou nenhum dos compostos estudados.

#### **4.2.3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM CARVÃO ATIVO**

##### **4.2.3.1 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE SPE COM CARVÃO ATIVO EM PÓ**

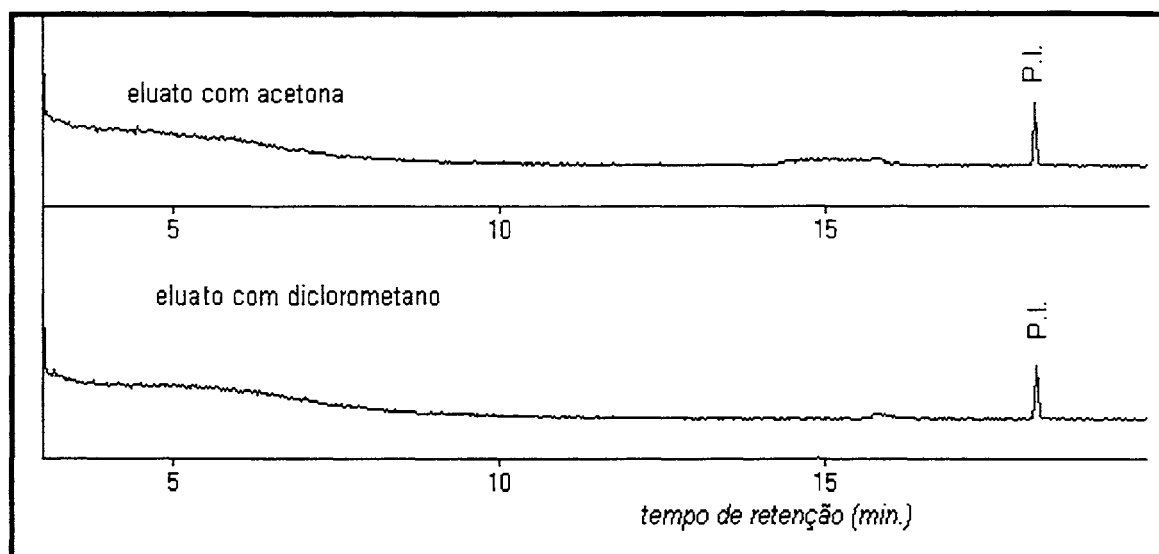
Para controle de todos os processos foram feitas análises de brancos. A Figura 39 apresenta uma análise de branco para SPE com carvão ativo em pó onde 25 mL de água bidestilada foram agitados com carvão ativo em pó por 45 minutos e submetidos a todo o processo analítico. Observa-se a ausência de compostos que venham a interferir na identificação dos analitos.



**Figura 38:** Cromatograma pelo monitoramento de íons (GC/MSD – modo SIM) do extrato obtido via SPE-XAD-4 do destilado da amostra A

Condições cromatográficas descritas na Tabela XI, página 58

Obs: A figura apresenta um “zoom” da região do cromatograma onde aparece o composto identificado, para facilitar a visualização.



**Figura 39:** Cromatogramas do íon total (GC/MSD) dos eluatos com acetona e com diclorometano, a partir da análise de branco (água bidestilada) por SPE com carvão ativo em pó

*Condições cromatográficas descritas na Tabela XI, página 58*

#### 4.2.3.1.1 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE ADSORÇÃO/EXTRAÇÃO

A Tabela XXIII apresenta a variação das áreas relativas para os picos cromatográficos dos constituintes da solução padrão aquosa a  $800 \mu\text{g L}^{-1}$  submetida a SPE com 0,5 g de carvão ativo em pó, quando se faz variar o tempo de extração/agitação de 15 a 45 minutos. Como pode ser observado, é bastante evidente o incremento nas recuperações dos compostos com o tempo de agitação, ou seja, de contato da solução com o adsorvente.

A partir destes resultados percebe-se que o tempo de 45 minutos é o ideal para a extração, com recuperações superiores a 90% para maior parte dos compostos. As baixas recuperações obtidas para nitrosaminas mais leves (DMN, MEN, NMOR e NPIR) podem ser devidas à perda por evaporação e pela forte interação destes compostos com a matriz aquosa.

**Tabela XXIII:** Influência do tempo de extração/agitação sobre a recuperação dos compostos por SPE com carvão ativo em pó (0,5 g), a partir de 25 mL de uma solução padrão aquosa a 800 µg L<sup>-1</sup>

composto	15 minutos			30 minutos			45 minutos		
	AR	RSD %	REC%	AR	RSD %	REC%	AR	RSD %	REC%
DMN	---	---	---	0,063	11,1	30,8	0,132	12,3	64,1
MEN	0,308	6,2	46,5	0,318	12,2	47,9	0,438	12,4	65,9
DEN	0,395	4,6	41,0	0,625	7,8	64,8	0,947	8,2	98,3
NPIR	0,354	5,4	49,1	0,441	11,6	61,3	0,477	11,8	65,8
NMOR	0,310	8,7	46,5	0,455	4,2	68,2	0,490	12,7	73,4
DPN	0,607	6,4	42,0	0,941	5,7	65,1	1,401	12,2	96,9
NPIP	0,578	7,3	50,1	0,811	6,5	70,4	1,041	12,2	90,4
DBN	0,361	5,5	55,0	0,419	11,4	63,9	0,654	13,7	99,8

AR = área relativa; RSD % = desvio padrão percentual; REC% = percentual de recuperação

#### 4.2.3.1.2 INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE ADSORVENTE

Com base nos resultados apresentados fez-se um teste com 15 minutos de agitação, 25 mL de solução a 800 µg L<sup>-1</sup> e 1 g de carvão ativo, com o objetivo de verificar a influência da quantidade de adsorvente sobre o processo. Escolheu-se esta condição por ser a que apresentou menor recuperação usando 0,5 g de carvão, logo seria aquela que poderia ser melhorada, uma vez que a melhor condição anterior já apresentava uma recuperação próxima a 100%.

A Tabela XXIV apresenta os resultados para este experimento e a comparação com os dados do experimento. O aumento da recuperação com o aumento da massa do adsorvente sugere a saturação dos 0,5 g de carvão ativo para solução estudada e indica que a quantidade de 1,0 g é mais adequada para esta amostra.

Através da análise desta tabela e deste gráfico percebe-se que um aumento na quantidade de carvão ativo permite que se trabalhe em tempos de extração menores, tornando o método eficiente e rápido.

**Tabela XXIV:** Influência da quantidade de fase estacionária na área relativa dos picos cromatográficos para 25 mL de solução padrão a  $800 \mu\text{g L}^{-1}$  submetida a SPE por 15 minutos

composto	0,5 g			1,0 g		
	AR	RSD %	REC%	AR	RSD %	REC%
DMN	---	---	---	0,113	7,1	60,2
MEN	0,308	6,2	46,5	0,457	11,1	69,0
DEN	0,395	4,6	41,0	0,899	11,9	93,3
NPIR	0,354	5,4	49,1	0,397	14,2	55,5
NMOR	0,310	8,7	46,5	0,350	14,3	52,4
DPN	0,607	6,4	42,0	1,207	11,3	83,0
NPIP	0,578	7,3	50,1	0,920	15,3	79,7
DBN	0,361	5,5	55,0	0,564	13,2	85,9

AR = área relativa; RSD % = desvio padrão percentual; REC% = percentual de recuperação

#### 4.2.3.1.3 ESTUDOS DE RECUPERAÇÃO A PARTIR DO CARVÃO ATIVO EM PÓ

Esta parte do trabalho foi desenvolvida com amostras sintéticas aquosas e com amostras de salsicha (amostra A – salsichas de marca brasileira) marcadas.

Conforme se pode observar na Tabela XXV os compostos NPIR, NMOR e DMN apresentaram recuperações mais baixas que os demais, possivelmente em função de sua polaridade e/ou adsorção irreversível no carvão ativo.

A redução nos valores de recuperação obtidos a partir de amostras de salsicha marcadas pode ser explicada pela concorrência entre os compostos lipídicos e as nitrosaminas, associada às perdas durante o processo de destilação a vácuo por arraste de vapor.

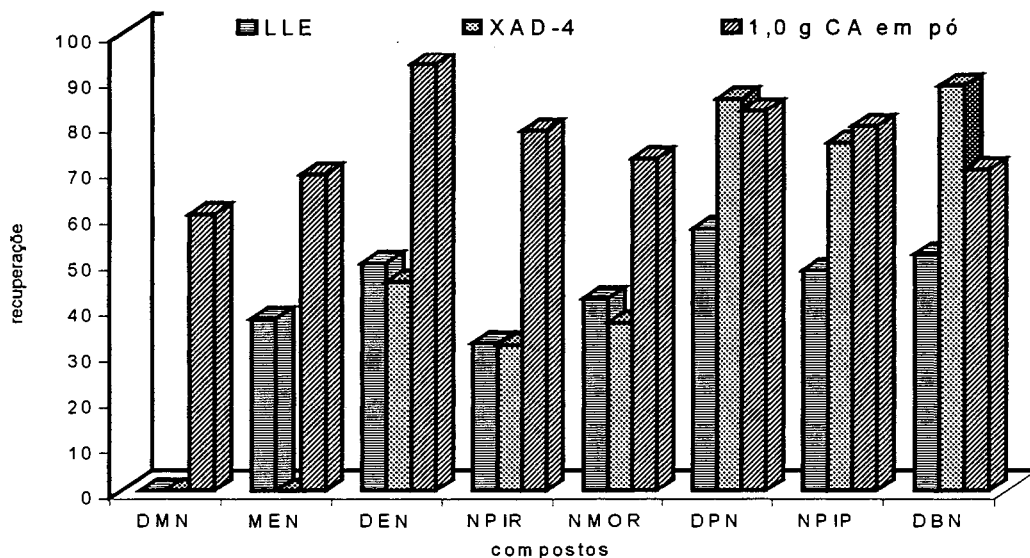
**Tabela XXV** . Estudos de recuperação para processo em batelada com carvão ativo em pó. (GC/FID)

composto	200 mL de solução padrão 50 $\mu\text{g L}^{-1}$		150 g da amostra A marcada com 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	% REC	%RSD	% REC	%RSD
DMN	22,9	5,6	14,4	6,8
DEN	59,5	18,8	43,3	12,9
NPIR	32,56	16,7	14,0	21,4
NMOR	38,18	5,6	12,6	18,7
NPIP	77,0	5,7	49,1	15,1
DBN	105,5	5,8	28,6	22,5

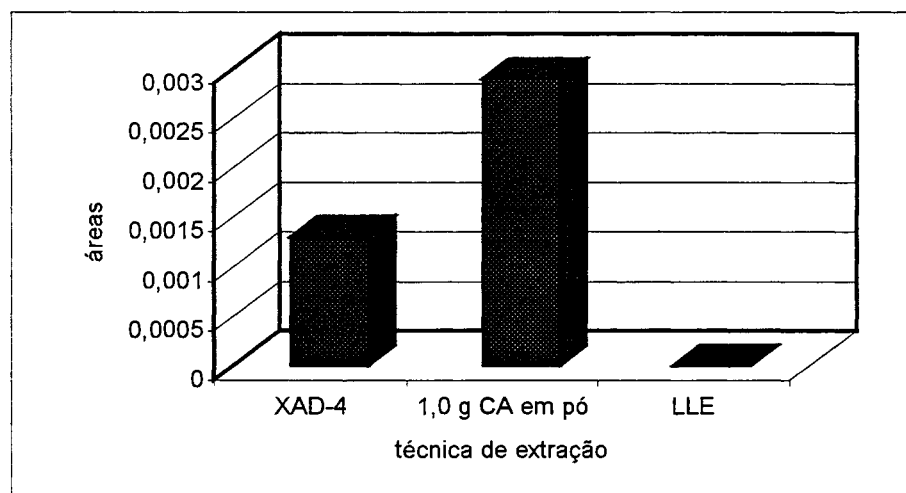
%RSD: Desvio padrão percentual

### 4.3 COMPARAÇÃO DAS TRÊS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

A Figura 40 apresenta a comparação das recuperações obtidas para as três técnicas de extração usadas (LLE, SPE-XAD-4 e SPE com carvão ativo em pó) aplicadas a 25 mL de uma solução padrão a 800  $\mu\text{g L}^{-1}$ . De forma geral os compostos comportam-se de forma semelhante, sendo que os mais polares apresentam menores recuperações. A Figura 41 apresenta a comparação das áreas de NPIP, único composto identificado na amostra estudada, obtidas a partir do destilado aquoso da amostra A por LLE, SPE-XAD-4 e SPE com carvão ativo em pó. Pode-se observar que o carvão ativo representa a melhor alternativa para pré-concentração dos extratos, com melhores resultados qualitativos e quantitativos.



**Figura 40:** Variação das recuperações para 25 mL da amostra ( $800 \mu\text{g L}^{-1}$ ) extraídas com as três técnicas estudadas (LLE, SPE-XAD-4 e SPE com carvão ativo)



**Figura 41:** Variação das áreas relativas do composto NPIP para destilados obtidos de 150 g da amostra A extraída por arraste de vapor e pré-concentrada usando as três técnicas estudadas (LLE, SPE-XAD-4 e SPE - com carvão ativo em pó)

A análise destas figuras permite que se conclua que o método usando SPE com carvão ativo apresenta melhor performance para o conjunto de nitrosaminas estudadas sendo, portanto, a metodologia escolhida para a análise das amostras

reais. Estudos adicionais no sentido de desenvolver o trabalho em faixas de concentração mais baixas e caracterizar o método de SPE com carvão ativo foram desenvolvidos por SPE/MEKC.

## **4.4 APLICAÇÃO DO CARVÃO ATIVO NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE NITROSAMINAS PARA ANÁLISE POR MEKC**

### **4.4.1 ESTUDO DO CARVÃO ATIVO EM PÓ**

#### **4.4.1.1 ESTUDO DA MASSA DO CARVÃO ATIVO EM PÓ**

A Tabela XXVI apresenta as recuperações obtidas a partir da análise por MEKC de 25 mL de duas misturas sintéticas aquosas (400 e 800  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) pré-concentradas com CA em pó usando massas de adsorvente de 0,5 e 1,0 g e agitação por 45 min.

Observa-se no gráfico apresentado na Figura 42 construído a partir destes dados, que o aumento da massa de carvão leva a um incremento nas recuperações para os compostos DEN, NPIP. O estudo do gráfico também revela a baixa capacidade adsorvente do CA em pó para os compostos mais polares como DMN, NMOR e NPIR, como resultado provável de sua elevada interação com a matriz aquosa.

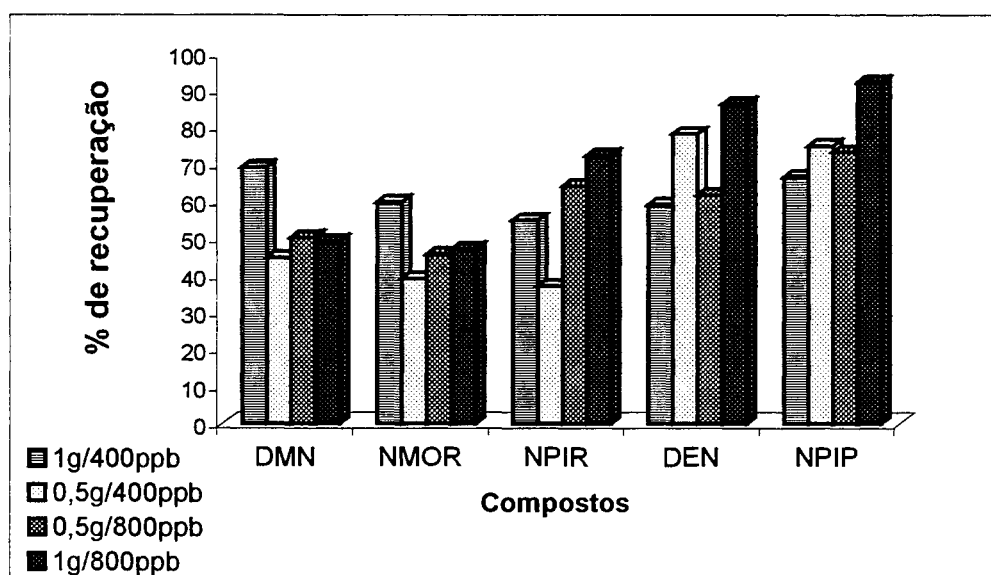
A determinação dos analitos em amostras sintéticas na concentração de 800  $\mu\text{g.L}^{-1}$  permitiu a detecção dos compostos DMN, NMOR e NPIR junto a água residual indicando a possível saturação da fase adsorvente ou maior interação dos analitos com a matriz aquosa. Também a presença de composto junto ao eluato de DCM indica que o volume inicial de acetona deveria ser aumentado, porém foram mantidos os volumes do sistema de eluição uma vez que o objetivo é trabalhar em faixas de concentrações menores.



**Tabela XXVI:** Variação na recuperação para o processo de SPE com CA em pó, avaliado por MEKC, usando diferentes concentrações e diferentes massas de adsorvente\*

Composto	400 µg L <sup>-1</sup>				800 µg L <sup>-1</sup>			
	0,5 g CA	%RSD	1,0 g CA	%RSD	0,5 g CA <sup>a</sup>	%RSD	1,0 g CA <sup>a</sup>	%RSD
DMN	44,7 %	7,9	69,0 %	6,9	50,2 %	4,7	49,2 %	8,18
NMOR	39,0 %	10,9	59,6 %	6,9	45,7 %	25,0	47,1 %	11,63
NPIR	37,0 %	11,5	54,8 %	11,9	63,9 %	15,7	72,1 %	8,95
DEN	78,0 %	12,7	58,9 %	10,2	61,5 %	25,0	86,1 %	1,46
NPIP	74,8 %	12,2	66,4 %	7,9	73,1 %	24,4	92,0 %	6,21

(\*) 45 min agitação, 25 mL de amostra



**Figura 42:** Comparação entre as recuperações obtidas no processo de SPE com CA em pó, avaliado por MEKC, usando diferentes concentrações e diferentes massas de adsorvente

As análises por MEKC permitiram o estudo direto das águas residuais do processo de extração, como está apresentado na Tabela XXVII.

**Tabela XXVII:** Distribuição dos compostos nos eluatos e na água residual no processo de pré-concentração a partir de 1 g de CA em pó, 25 mL de uma solução padrão a de 800 µg L<sup>-1</sup> e 45 min de agitação

compostos	acetona		DCM		Recup. total		água residual	
	REC %	%RSD	REC %	%RSD	REC %	%RSD	REC %	%RSD
DMN	33,2	18,3	16,1	22,7	49,2	8,18	34,8	17,04
NMOR	28,8	9,5	18,3	15,2	47,1	11,63	30,1	15,85
NPIR	41,3	8,0	30,9	10,3	72,1	8,95	11,2	31,10
DEN	55,9	10,9	30,2	17,8	86,1	1,46	---	---
NPIP	68,1	7,5	19,8	19,9	92,0	6,21	---	---

*% RSD: desvio padrão relativo percentual*

Observa-se que os compostos como DMN, NMOR e NPIR permanecem junto à água residual em concentrações que permitem a detecção direta enquanto os compostos DEN E NPIP não foram detectados na água residual. Estes resultados confirmam os obtidos por GC-FID. Os valores dos RSD indicam uma relativa variabilidade, porém característica dos processos de SPE em baixas concentrações.

#### 4.4.1.2 ESTUDO DO TEMPO DE AGITAÇÃO

A Tabela XXVIII apresenta os resultados referentes à variação no tempo de agitação da amostra com o CA em pó no processo de extração de nitrosaminas a partir de amostras aquosas. O estudo do tempo de agitação por MEKC confirma os dados obtidos por GC-FID, revelando um incremento das recuperações com o aumento no tempo de agitação, principalmente para os compostos de mais baixa polaridade.

Como se pode comprovar na Tabela XXVIII, o aumento do tempo de agitação leva a um incremento na recuperação dos compostos principalmente DEN e NPIP.

**Tabela XXVIII:** Variação na recuperação para o processo de SPE com CA em pó, avaliado por MEKC, usando diferentes tempos de agitação \*

compostos	15 min		30 min		45 min	
	% REC	%RSD	% REC	%RSD	% REC	%RSD
DMN	47,1	23,6	63,0	7,9	44,7	7,9
NMOR	30,5	11,6	30,1	37,4	39,0	10,9
NPIR	39,0	7,3	36,2	10,1	37,0	11,5
DEN	54,6	5,6	75,5	8,4	75,0	12,7
NPIP	52,0	10,9	62,9	6,5	74,3	12,2

(\*) 0,5g de carvão ativo, mistura sintética a 400  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; %RSD: desvio padrão relativo percentual

#### 4.4.1.3 ESTUDO EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES – 50 $\mu\text{g L}^{-1}$

Com objetivo de trabalhar em faixas de concentrações mais baixas aplicou-se o procedimento para maiores volumes de amostra, tendo-se optado por 200 mL de amostra aquosa.

A Tabela XXIX reúne as recuperações obtidas a partir da pré-concentração de 200 mL de solução padrão a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  variando massa de adsorvente (0,5 e 1,0 g) e tempo de agitação (30 e 45 min).

**Tabela XXIX:** Variação na recuperação para o processo de SPE com CA em pó, avaliado por MEKC, usando diferentes tempos de agitação e diferentes massas de adsorvente\*

Compostos	30 min				45 min			
	0,5 g	%RSD	1,0 g	%RSD	0,5g	%RSD	1,0 g	%RSD
DMN	nd	---	nd	---	nd	---	nd	---
NMOR	21,6 %	5,16	23,9 %	0,96	37,5 %	4,04	33,2 %	13,8
NPIR	28,0 %	5,58	40,2 %	16,68	38,1 %	1,72	48,4 %	19,8
DEN	45,4%	8,23	50,3 %	11,75	91,5 %	5,9	79,0 %	12,3
NPIP	74,0 %	0,65	75,8 %	1,74	86,4 %	8,8	88,9 %	5,3

(\*) concentração: 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , volume de amostra: 200 mL

Os resultados confirmam os anteriores definindo assim as condições de trabalho para baixas concentrações: 200 mL de amostra, 45 min de agitação, 1 g de carvão ativo em pó.

#### 4.4.1.4 CARATERIZAÇÃO DO MÉTODO DE SPE/MEKC

As Tabelas XXX e XXXI apresentam as equações resultantes da regressão linear e os principais parâmetros para caracterização do método SPE analisado por MEKC, obtidos a partir da construção de curvas de calibração por pré-concentração de misturas sintéticas 100 e 200 mL no intervalo de 50 – 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

**Tabela XXX:** Caracterização do método SPE/MEKC na faixa de 50 a 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , usando um volume de amostra 100 mL

Analitos	Equação	r	S y/x	LD	LQ	RSD %
DMN	a=604,9±109,1 b=9,65±0,20	0,997	279,65	33,9	113,3	4,7
NMOR	a=142,0±91,8 b=5,79±0,18	0,994	235,14	47,6	158,5	15,4
NPIR	a=722,3±201,8 b=11,9±0,38	0,993	517,16	50,9	169,8	7,9
DEN	a=-224,17±278,07 b=14,55±0,55	0,991	738,29	59,4	198,0	11,6
NPIP	a=-893,62±300,02 b=16,93,2±0,58	0,993	768,7	53,2	177,21	6,0

*a: coeficiente linear; b: coeficiente angular; S x/y: desvio padrão dos resíduos; r: coeficiente de correlação linear; obtidos pela análise da variância (ANOVA) para validação do método; LD limite de detecção; LQ limite de quantificação (LD e LQ em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ); RSD %: desvio padrão relativo percentual*

Observa-se que o processo de pré-concentração fez com que os limites de detecção do método MEKC que variavam entre 160 a 270  $\mu\text{g L}^{-1}$  no processo sem pré-concentração (Tabela XIX) baixassem para os intervalos de 33,9 – 60,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e

22,5 - 35,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para 100 e 200 mL respectivamente. O processo de SPE com carvão ativo mostrou-se adequado para pré-concentração de nitrosaminas para análise por eletroforese capilar.

**Tabela XXXI:** Caracterização do método SPE/MEKC na faixa de 50 a 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , usando um volume de amostra 200 mL

analitos	Equação	r	S y/x	LD	LQ	RSD %
DMN	a=1091,0 $\pm$ 161,1 b=17,3 $\pm$ 0,31	0,998	412,83	27,8	92,6	4,0
NMOR	a=342,0 $\pm$ 124,4 b=10,36 $\pm$ 0,240	0,996	318,8	35,0	120,0	16,6
NPIR	a=1568,5 $\pm$ 148,7 b=19,80 $\pm$ 0,29	0,998	389,9	22,5	75,1	17,4
DEN	a=-1761,7 $\pm$ 233,7 b=28,71 $\pm$ 0,31	0,998	598,8	26,2	87,3	22,7
NPIP	a=-865,8 $\pm$ 212,4 b=28,25 $\pm$ 0,42	0,998	870	23,6	78,7	20,7

a: coeficiente linear; b: coeficiente angular; S x/y: desvio padrão dos resíduos; r: coeficiente de correlação linear; obtidos pela análise da variância (ANOVA) para validação do método; LD limite de detecção; LQ limite de quantificação (LD e LQ em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ); RSD %: desvio padrão relativo percentual

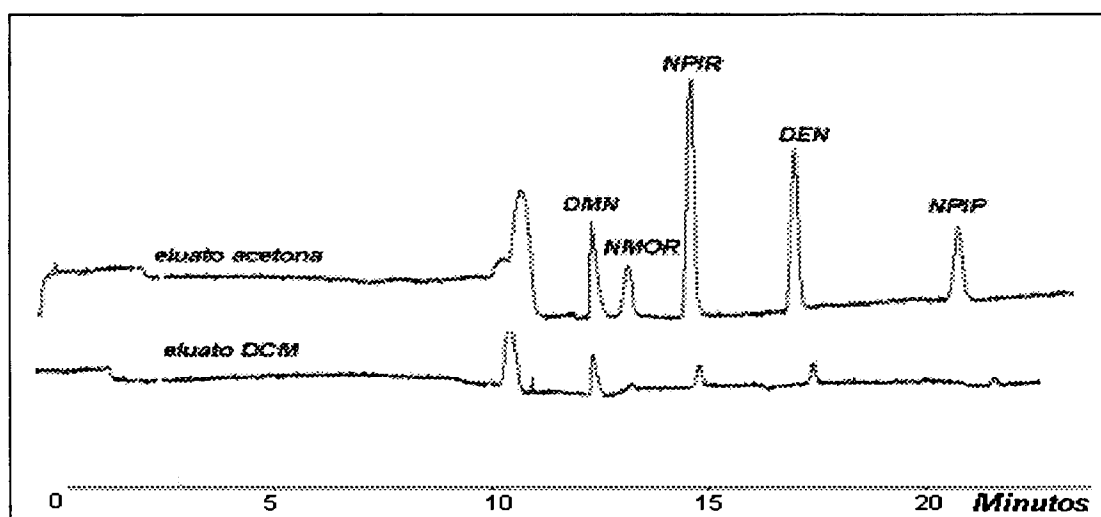
#### 4.4.1.5 APLICAÇÃO A AMOSTRAS SINTÉTICAS AQUOSAS

A Tabela XXXII apresenta os resultados da aplicação da metodologia desenvolvida a amostras sintéticas aquosas. A aplicação do método SPE com carvão ativo em pó e análise por MEKC a diferentes misturas sintéticas aquosas permitiu determinar os analitos com um erro variando de 1,2 - 31,4% dependendo da nitrosamina, conforme resultados apresentados nesta tabela.

A Figura 43 apresenta os eletroferogramas para os eluatos de acetona e DCM obtidos para amostra 3, como exemplo da aplicação.

**Tabela XXXII:** Aplicação da técnica de SPE associada a MEKC para a análise de amostras sintéticas nas condições definidas no item 4.4.1.3

Amostra sintética	Analito	conc. adicionada $\mu\text{g.L}^{-1}$	conc. encontrada $\mu\text{g.L}^{-1}$	Erro (%)
1	DMN	300	237	-21,0
	NMOR	50	44	-12,0
	NPIR	300	277	-7,7
	DEN	1000	988	-1,2
	NPIP	800	734	-9,0
2	NMOR	700	617	-11,9
	NPIR	900	882	-3,0
	DEN	200	168	-6,0
	NPIP	400	333	-6,8
3	DMN	300	206	-31,3
	NMOR	500	343	-31,4
	NPIR	800	570	-28,8
	DEN	600	633	+5,5
	NPIP	300	252	-16,0



**Figura 43:** Comparação entre os eletroferogramas dos eluatos de acetona e DCM para amostra sintética 3 após a pré-concentração por SPE com carvão ativo em pó nas condições definidas no item 4.4.1.3

Condições: injeção eletrocínética 10 kV tempo 10 s, voltagem de separação 10 KV, tampão 5 (80  $\text{mmolL}^{-1}$  de SDS, pH 6,6, 50  $\text{mmolL}^{-1}$  fosfato/borato e sem CD)

#### 4.4.1.6 APLICAÇÃO A AMOSTRAS REAIS

Conforme está descrito no capítulo 3, foram analisadas duas marcas de salsicha em conserva (enlatadas):

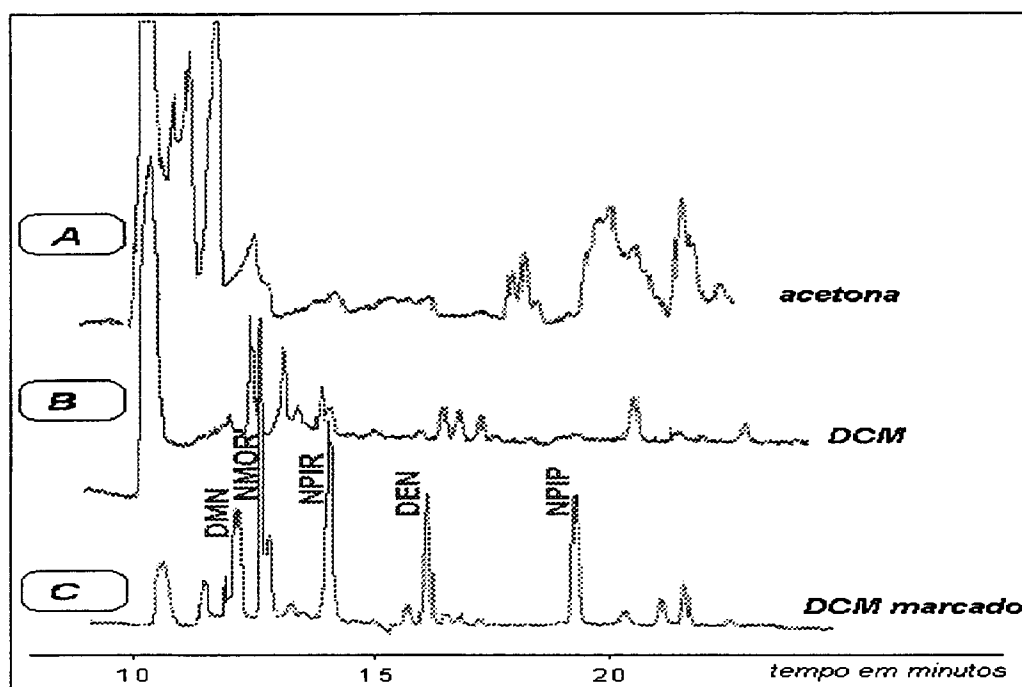
Amostra A: salsicha de marca brasileira (análise da massa da salsicha), e

Amostra B: salsicha de marca espanhola defumada (análise do líquido de conserva e a da massa da salsicha).

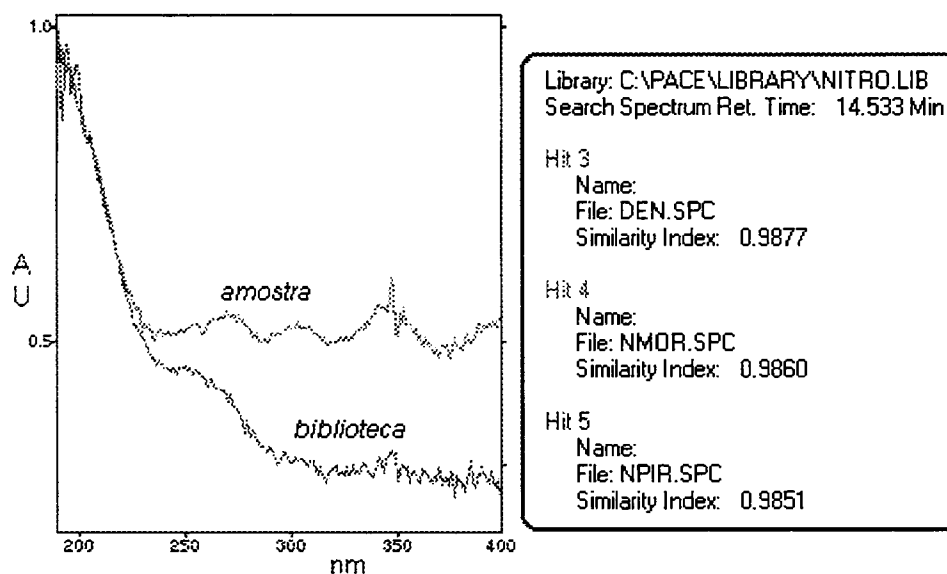
##### 4.4.1.6.1 LÍQUIDO DE CONSERVA BRUTO

Primeiramente o líquido de conserva bruto da amostra B, sem sofrer o procedimento de destilação a vácuo por arraste de vapor, foi submetido ao processo de pré-concentração com carvão ativo em pó.

Os eletroferogramas dos eluatos de acetona e DCM bem como do eluato de DCM marcado com  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de cada padrão, estão apresentados na Figura 46. Pela comparação entre estes eletroferogramas observa-se a presença de vários picos que se sobrepõem e correspondem a compostos que coeluem com as nitrosaminas. Seus espectros coincidem em mais de 98% com os das nitrosaminas, mas como o grupo cromóforo NNO gera espectros na zona do UV sem muitos detalhes, serve apenas como um indicativo da possível presença dos analitos. Uma técnica mais segura para identificação dos compostos é exigida. Para melhorar a avaliação foi construída uma biblioteca de espectros UV-Vis para cada um dos padrões, ao se comparar os espectros gerados pelos picos do eletroferograma e a biblioteca, encontraram-se graus de coincidência bastante elevados para todos os compostos. A Figura 45 apresenta uma comparação entre o espectro obtido a partir da análise do pico identificado como DEN em uma amostra fortificada e os dados da biblioteca, criada no equipamento, a partir de padrões. Como pode ser observado, o grau de semelhança do espectro da amostra com os espectros padrões é superior a 98 % para DEN, NMOR e NPIR (coeficiente de similaridade de 0,9877, 0,9860 e 0,9851 respectivamente).



**Figura 44:** Comparação entre os eletroferogramas dos eluatos obtidos da SPE com carvão ativo em pó aplicada ao líquido de conserva da amostra B, sem destilar (A) acetona; (B) DCM; (C) DCM marcado com de 5 mg L<sup>-1</sup> da mistura de padrões. Condições descritas na Tabela XII, página 59

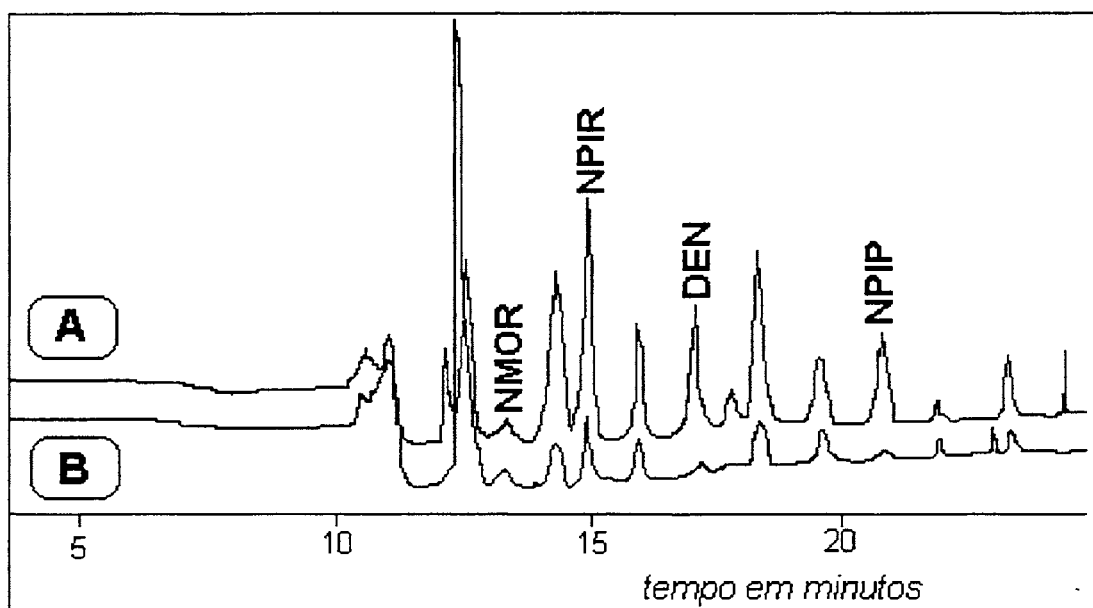


**Figura 45:** Comparação entre os espectros de UV-Vis da biblioteca e do possível analito DEN detectado no líquido de conserva da amostra B



## 4.4.1.6.2 LÍQUIDO DE CONSERVA DESTILADO

A Figura 46 apresenta os eletroferogramas dos eluatos de acetona obtidos na extração do destilado do líquido de conserva da amostra B.



**Figura 46:** Comparação entre eletroferogramas obtidos a partir dos eluatos de acetona usando CA em pó e 150 g de líquido de conserva destilado (A) amostra fortificada com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (B) amostra sem marcar  
Condições descritas na Tabela XII, página 59

Ao passar o líquido de conserva da amostra B pelo processo de destilação a vácuo por arraste de vapor, os eletroferogramas revelaram a redução das áreas e, em muitos casos, a eliminação dos compostos considerados interferentes na análise anterior, permitindo a detecção dos compostos no eluato de acetona. Isto indica que o processo de destilação junto com o processo de pré-concentração com carvão ativo é adequado para o *clean up* deste tipo de amostra.

O estudo dos eluatos, pela coincidência dos tempos de migração, espectros, e aumento da área dos picos na amostra fortificada antes do processo de destilação, sugere a presença dos compostos NMOR, NPIR, DEN e NPIP, indicados na Figura 46. O composto DMN sofre interferência de um composto que apresenta o mesmo tempo de migração eletroforética.

A Tabela XXXIII apresenta os resultados obtidos a partir do estudo de amostras fortificadas e não fortificadas do líquido de conserva para amostra B.

**Tabela XXXIII:** Valores de recuperação obtidos para os compostos a partir de 150 g do destilado do líquido de conserva da amostra B

compostos	amostra sem marcar		amostra fortificada com 1 mg kg <sup>-1</sup>		diferença	% REC
	Conc.*	% RSD	Conc.*	% RSD		
NMOR	0,02	2,5	0,36	9,7	0,34	34,0
NPIR	0,12	1,8	0,42	9,1	0,30	29,5
DEN	0,02	5,5	0,26	8,5	0,24	24,5
NPIP	0,02	2,1	0,23	8,6	0,21	21,2

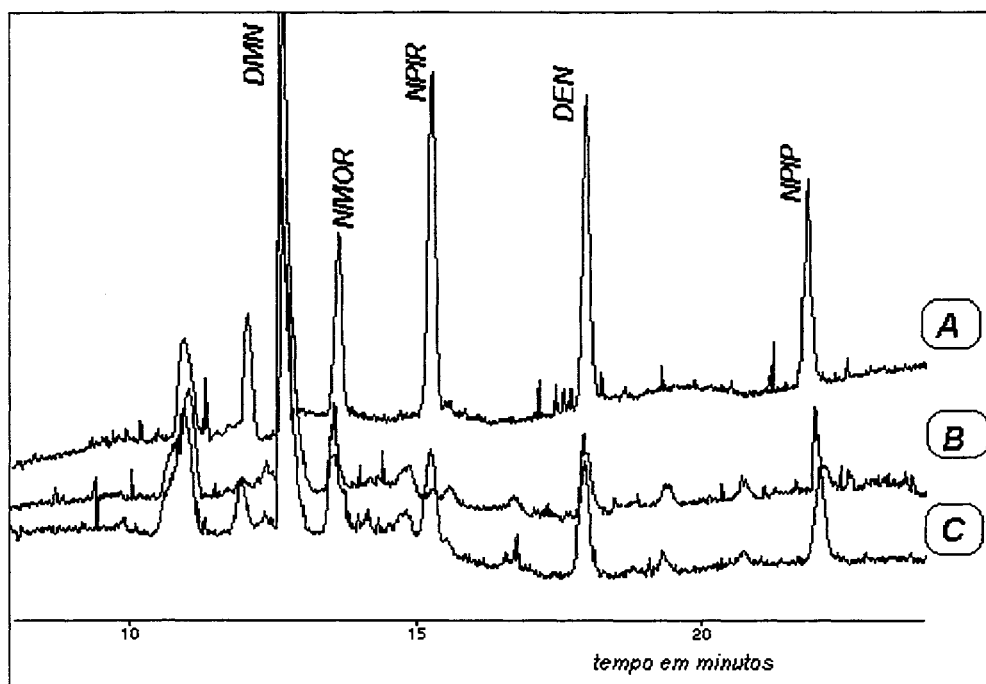
(\*) em mg.kg<sup>-1</sup>

Os baixos valores de recuperação obtidos para os compostos podem ser devidos à alta concentração de padrão adicionado (1 mg kg<sup>-1</sup>), não sendo totalmente extraído durante a destilação a vácuo por arraste de vapor.

O elevado valor encontrado para o composto NPIR confirma dados da literatura que indicam este composto como sendo a nitrosamina majoritária em produtos cárnicos.

#### 4.4.1.6.3 MASSA DA SALSICHA

A Figura 47 apresenta a comparação entre os eletroferogramas de um padrão de 10 mg kg<sup>-1</sup> (A), do eluato de acetona a partir de uma amostra (massa da salsicha B) fortificada com 100 µg kg<sup>-1</sup> (B) e o mesmo eluato adicionado com a mistura padrão (C). Este procedimento confirma, através do aumento das áreas, a identificação dos picos como os analitos adicionados à amostra original. O primeiro pico, que está sem identificação é referente ao metanol utilizado na preparação dos padrões. A Tabela XXXIV apresenta os valores de recuperação obtidos para a análise da massa de salsichas da amostra B.



**Figura 47:** Comparação entre eletroferogramas: (A) mistura padrão a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , (B) eluato com acetona do destilado da amostra B marcado com  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  da mistura padrão de nitrosaminas, (C) eluato com acetona da amostra B marcado com  $5 \text{ mg L}^{-1}$  da mistura padrão de nitrosaminas  
Condições descritas na Tabela XII, página 59

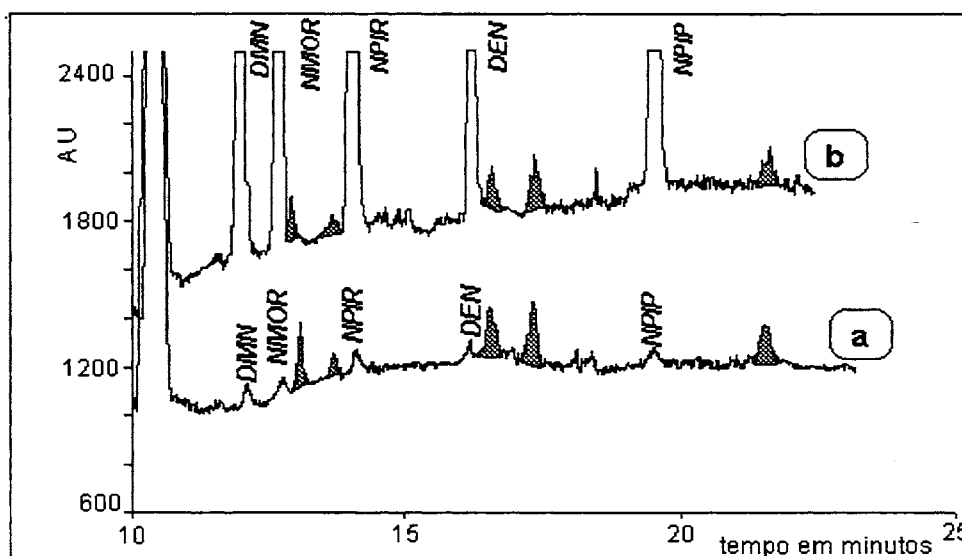
**Tabela XXXIV:** Valores de recuperação obtidos para os compostos a partir de 150 g do destilado da massa da salsicha Amostra B

compostos	amostra fortificada com $100 \mu\text{g kg}^{-1}$		amostra sem marcar		% REC
	conc.*	%RSD	conc.*	%RSD	
NMOR	85,0	5,0	15,5	13,8	69,5
NPIR	29,3	15,9	8,3	12,2	11,6
DEN	67,3	10,0	3,5	0,90	63,8
NPIP	64,5	19,0	5,6	7,5	58,9

(\*) concentrações em  $\mu\text{g.kg}^{-1}$

Embora a comparação dos espectros apresente altos valores de coincidência, podemos observar que as concentrações de alguns compostos apresentam-se elevados sugerindo uma possível coeluição de outros compostos presentes na matriz da amostra. Mesmo assim, o composto NPIR apresenta relativamente elevado valor de concentração, de acordo com o esperado, apesar de apresentar baixa recuperação.

A Figura 48 apresenta comparação entre os eletroferogramas do mesmo eluato de Acetona (amostra A), sendo que no eletroferograma (A), foi adicionado com  $5 \text{ mg L}^{-1}$  dos padrões. Fica bastante claro a localização dos possíveis picos correspondentes aos analitos identificados. A análise dos espectros de absorção dos picos identificados apresenta graus de semelhança com os obtidos a partir dos padrões de nitrosaminas variando de 85 – 99%. Os compostos NPIP, NMOR e NPIR foram confirmados por GC/MSD, o que sugere que o método SPE/MEKC permite a determinação dos compostos. Os resultados desta análise estão tabulados na Tabela XXXV.



**Figura 48:** Comparação entre eletroferogramas: (a) eluato de acetona para amostra A (b) repetição do mesmo eluato, adicionado de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de mistura padrão  
Obs.: os picos pintados pertencem a interferentes da matriz, comuns às duas amostras

*Condições descritas na Tabela XII, página 59*

**Tabela XXXV:** Resultados obtidos para a análise quantitativa da massa de salsicha da amostra A, usando SPE com CA em pó e MEKC

composto	% sem.	conc.*	%RSD	FC	Valor corrigido
DMN	89	3,1	10,1	2,0	6,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$
NMOR	99	3,2	6,3	1,4	4,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$
NPIR	95	7,2	22,6	8,6	62,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$
DEN	91	4,6	10,2	1,5	6,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$
NPIP	85	7,9	11,7	1,7	13,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$

(\*) concentrações em  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; % sem.: percentual de semelhança dos espectros; % RSD: desvio padrão relativo percentual; FC: fator de correção

#### 4.4.2 ESTUDO DO USO DE CARVÃO ATIVO GRANULAR

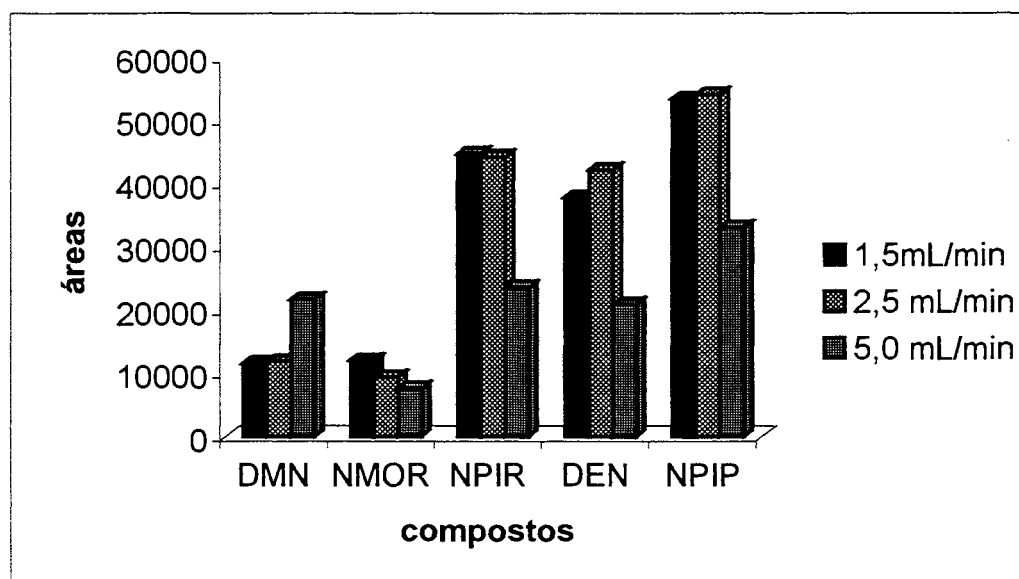
O procedimento com carvão ativo em pó apresentou resultados que permitiram a determinação de nitrosaminas ao nível de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (ppb), porém o procedimento é muito trabalhoso, lento e expõe o analista a elevados riscos de contaminação. Em função disto os estudos foram direcionados para o uso do carvão granular, com o qual se pode trabalhar no processo de leito fixo (em coluna). Isto representa uma redução no tempo de análise, ganho em segurança para o pessoal de laboratório e menor manuseio da amostra, reduzindo o risco de contaminação.

##### 4.4.2.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE SPE EM LEITO FIXO

Através dos dados da literatura e dos resultados obtidos para o carvão em pó optou-se por usar 1 g de massa de adsorvente. Iniciou-se testando o método em amostras aquosas.

O fluxo da amostra aquosa através do leito de carvão ativo, no processo de adsorção, foi otimizado utilizando uma mistura sintética com diferentes concentrações e analisando o extrato através de MEKC. Os resultados estão apresentados na Figura 49, e representam a média de, pelo menos, três

determinações, cujo desvio padrão relativo percentual das medidas de área variou entre 2,28 e 11,68 %.

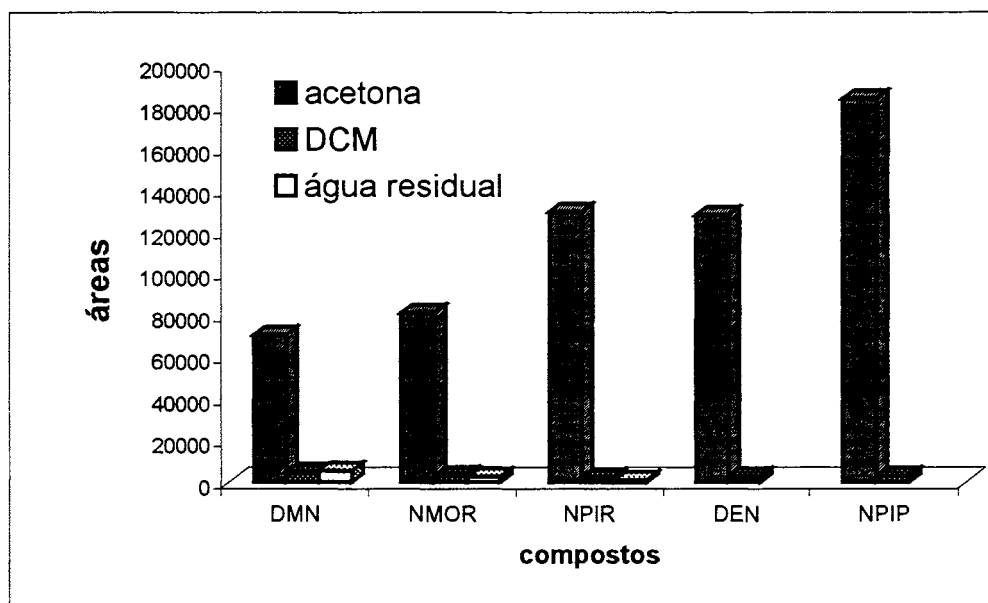


**Figura 49:** Variação das áreas dos picos no eletroferograma para os compostos de acordo com a variação no fluxo da eluição da amostra aquosa usando SPE com carvão ativo granular

Através da observação da Figura 49 determinou-se que o fluxo de 2,5 mL proporciona melhores recuperações para todo conjunto de nitrosaminas. Quando o processo é conduzido com a máxima vazão (5 mL min<sup>-1</sup> – torneira totalmente aberta), ocorrem significativas reduções nas áreas dos compostos NPIP, NPIR, DEN, indicando a necessidade de um tempo de contato um pouco maior para efetivar a adsorção.

#### 4.4.2.2 ESTUDO DAS RECUPERAÇÕES E SATURAÇÃO DA FASE PARA CARVÃO ATIVO GRANULAR

As nitrosaminas apresentaram comportamento semelhante ao descrito pelo processo com carvão ativo em pó. O processo de eluição é mais eficiente com CA granulada, com a totalidade dos compostos sendo arrastados com o primeiro volume de acetona. A Figura 50 ilustra a distribuição dos compostos no eluato de acetona, de DCM e na água residual para 200 mL de uma amostra sintética a 1000 µg L<sup>-1</sup>.



**Figura 50:** Variação das áreas dos picos dos compostos no eluato de acetona, de DCM e na água residual para 200 mL de uma amostra sintética  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ , usando SPE com CA granular e MEKC

Observa-se nesta figura que a acetona consegue recuperar a grande maioria dos compostos em sua quase totalidade.

A Tabela XXXVI apresenta os resultados para o estudo das recuperações usando diferentes concentrações de nitrosaminas em amostras aquosas. Observa-se nesta tabela que em baixa concentração ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ) nenhum composto foi detectado na água residual, indicando máxima adsorção no carvão ativo. Por outro lado, nesta concentração a detecção fica bastante prejudicada e a água residual teria que sofrer um processo de pré-concentração para permitir a conclusão de que nenhum composto seria detectado.

A partir de  $800 \mu\text{g L}^{-1}$ , o estudo direto das águas residuais do processo de SPE permitiu a detecção dos compostos DMN e NMOR (mais polares). Este fato é confirmado com o estudo de amostras sintéticas mais concentradas ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ), neste caso a percentagem de recuperação é reduzida assim como a percentagem de compostos que permanecem junto à água residual sofre um incremento. Este fato pode indicar a saturação da fase estacionária na concentração de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ .

**Tabela XXXVI:** Estudo das recuperações para SPE com CA granular analisado por MEKC, usando três diferentes concentrações da amostra sintética aquosa

Compostos	20 µg 25,0 mL (800 µg L <sup>-1</sup> )				10 µg 200 mL (50 µg L <sup>-1</sup> )			200 µg 200mL (1000 µg L <sup>-1</sup> )			
	eluato de acetona		água residual		eluato de acetona		água residual	eluato de acetona		água residual	
	% REC	% RSD	% REC	% RSD	% REC	% RSD	% REC	% REC	% RSD	% REC	% RSD
DMN	71,2	6,3	29,2	4.0	29,3	5.2	nd	19,3	5,64	50,2	4,2
NMOR	37,1	5.0	10,0	9.0	51,6	11.0	nd	21,6	2,62	58,7	5,0
NPIR	66,8	6.0	nd*	--	58,0	7,1	nd	42,0	11,8	13,1	2,4
DEN	78.3	4,0	nd	--	81.8	2.8	nd	39,6	5,9	nd	--
NPIP	103,6	4.0	nd	--	107.6	4.2	nd	39,2	3,64	nd	--

\* nd : não detectado;

#### 4.4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO DE SPE COM CARVÃO ATIVO GRANULAR E ANÁLISE POR MEKC

O procedimento em leito fixo apresentou maior precisão e exatidão quando comparado ao procedimento em batelada. As equações resultantes da regressão linear e os principais parâmetros para caracterização do método de SPE com carvão ativo granular analisado por MEKC encontram-se na Tabela XXXVII. Estes dados foram obtidos a partir da construção de curvas de calibração por pré-concentração de 200 mL de misturas aquosas sintéticas, entre 10 e 200 µg L<sup>-1</sup>.

Observa-se que os limites de detecção variaram entre 3,4 – 9,6 µg L<sup>-1</sup>, estando dentro da faixa exigida como pré-requisito para determinação de nitrosaminas. O estudo também permitiu a determinação de % RSD variando de 1 a 13,6 entre as medidas de área. A aplicação da metodologia a amostras sintéticas permitiu a estimativa de um erro relativo entre 1 e 8 % sendo que o maior valor é referente a DMN, composto que apresenta menor recuperação e que está na amostra sintética estudada em menor concentração, conforme a Tabela XXXVIII.



**Tabela XXXVII:** Caracterização do método de SPE com CA granular e análise por MEKC, usando 200 mL de amostra sintética aquosa

Analitos	Equação $y = a + bx$	r	S y/x	LD	LQ	RSD %
DMN	$a=101,59 \pm 150,4$ $b=47,9 \pm 1,32$	0,996	332,60	9,4	31,3	5,6
NMOR	$a=1173,35 \pm 79,1$ $b=69,7 \pm 0,69$	0,999	174,9	3,4	11,34	13,6
NPIR	$a=1769,1 \pm 304,9$ $b=94,09 \pm 2,68$	0,993	517,16	9,6	32,4	1,0
DEN	$a=1565,9 \pm 303,4$ $b=96,01 \pm 2,69$	0,996	671,17	9,5	31,6	11,4
NPIP	$a=1411,6 \pm 224,8$ $b=146,0 \pm 1,98$	0,999	497,19	4,6	15,4	2,8

*a: coeficiente linear; b: coeficiente angular; S x/y (desvio padrão dos resíduos); r: coeficiente de correlação linear, obtidos pela análise da variância (ANOVA) para validação do método; LD limite de detecção; LQ limite de quantificação (LD e LQ in  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); RSD %: desvio padrão relativo percentual*

**Tabela XXXVIII:** Estudo do erro percentual para a análise de uma amostra aquosa sintética analisada por MEKC nas condições otimizadas da SPE com CA granular

analito	Conc. adicionada*	Conc. encontrada*	Erro (%)
DMN	0,050	0,046	-8,0
NMOR	0,100	0,098	-2,0
NPIR	0,250	0,246	-1,6
DEN	0,300	0,293	-2,3
NPIP	0,200	0,206	+3,0

(\*) concentração medida em  $\text{mg L}^{-1}$

A melhora dos limites de detecção em relação ao processo com carvão ativo em pó se deve, provavelmente, à redução das perdas e à melhor repetibilidade do método. Como os limites de detecção foram calculados a partir do desvio padrão do coeficiente linear, uma maior concordância dos resultados implica em menores valores de LD e LQ.

A comparação dos coeficientes angulares evidencia que os compostos DEN, NPIR, NPIP apresentam maiores valores como resultado direto dos seus valores de recuperações e fatores de resposta.

## 4.5 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS POR SPE COM CARVÃO ATIVO EM PÓ POR CROMATOGRAFIA GASOSA

### 4.5.1 CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR POR IONIZAÇÃO EM CHAMA

A Tabela XXXIX apresenta os resultados para a análise qualitativa e quantitativa para o eluato de acetona de uma amostra de salsicha da amostra A (destilado a vácuo por arraste de vapor da massa de salsicha da amostra A – salsicha de origem brasileira).

**Tabela XXXIX:** Análise qualitativa e quantitativa do eluato com acetona da amostra A obtido por SPE com CA em pó e GC/FID

Compostos	Fator de correção**	conc.	%RSD	Valor corrigido
DMN	6,9	nd	--	--
DEN	2,3	nd	--	--
NPIR	7,1	0,10	10,0	0,71
NMOR	7,9	5,71	4,4	45,1
NPIP	2,0	0,50	21,4	1,0
DBN	3,5	0,50	20,1	1,75

\* massa de salsicha usada: 150 g

Resultados expressos em  $\mu\text{g.kg}^{-1}$

\*\* fator de correção que leva em conta as recuperações obtidas

O elevado valor encontrado para a concentração da NMOR ( $45,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), sugere a presença de algum interferente e indica a necessidade de confirmação através de outra técnica, por exemplo, GC/MSD.

## 4.5.2 CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

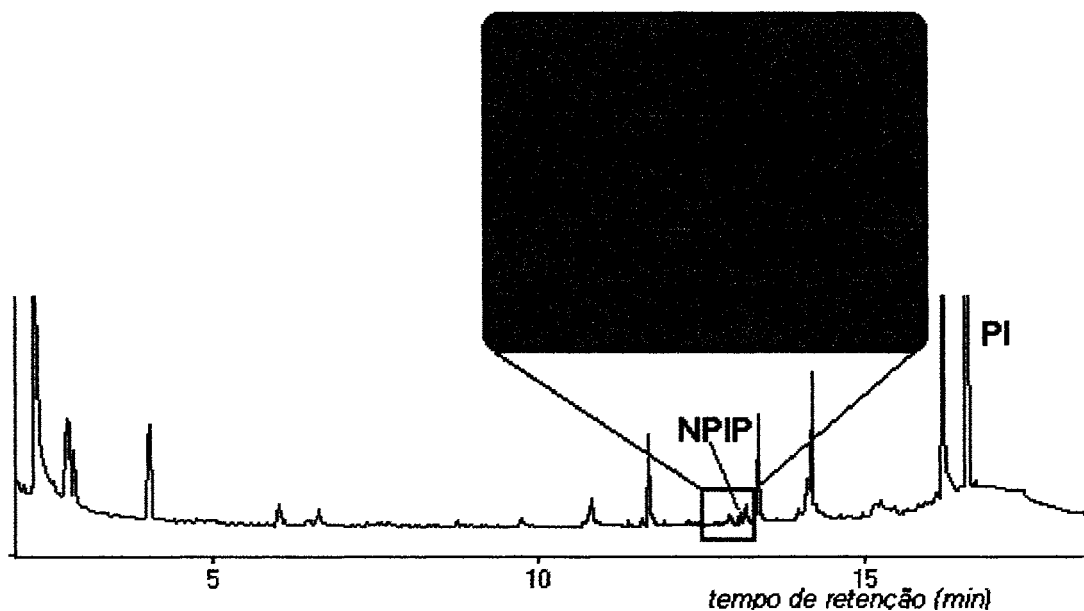
### 4.5.2.1 ANÁLISE QUALITATIVA

#### 4.5.2.1.1 ANÁLISE DO LÍQUIDO DE CONSERVA DA AMOSTRA A

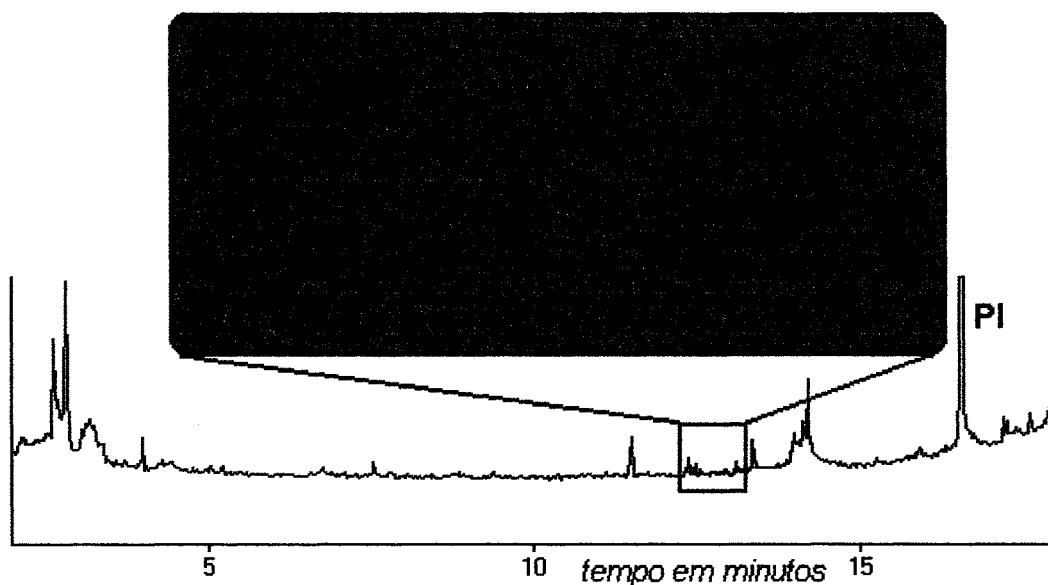
A Figura 51 apresenta o cromatograma obtido via GC/MSD para o eluato de diclorometano do líquido de conserva bruto (sem destilar) da amostra A. A Figura 52 apresenta o cromatograma obtido via GC/MSD para o eluato com diclorometano do destilado do líquido de conserva da amostra A e a Figura 53 apresenta o cromatograma obtido via GC/MSD para o eluato com DCM do destilado da massa de salsichas da amostra A. Todos os cromatogramas foram obtidos usando-se a coluna HP-1. O DCM foi evaporado até 1 mL tendo sido adicionado o padrão interno na concentração de 2 mg L<sup>-1</sup> a cada um dos extratos.

Percebe-se na Figura 51 apenas a presença da NPIR, na Figura 54 encontraram-se os compostos NPIR, NMOR e NPIP e na Figura 53 identifica-se a presença da NPIR e NPIP.

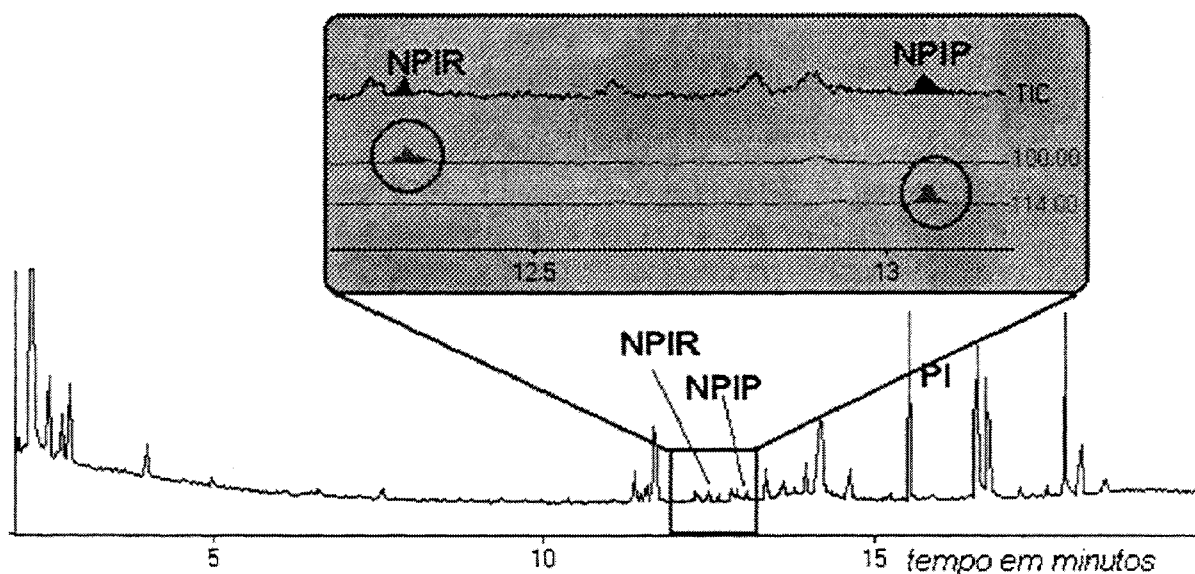
Conforme pode ser visualizado nas três últimas figuras, o modo SIM de análise no sistema GC/MSD permite a identificação seletiva dos compostos, mesmo que a matriz apresente outros componentes. Esta identificação seletiva é representada pelos cromatogramas de íons selecionados apresentados na base das figuras. Os círculos azuis apontam a identificação de forma inequívoca dos compostos. Estes cromatogramas são obtidos a partir da seleção dos íons correspondentes a cada uma das nitrosaminas estudadas, conforme está ressaltado na Tabela XI, página 58



**Figura 51:** Cromatograma (GC/MSD – modo SIM) do concentrado obtido a partir da análise direta do líquido de conserva das salsichas, via SPE com CA em pó. Coluna HP-1 e padrão interno na concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$   
*Condições descritas na Tabela XI, página 58*



**Figura 52:** Cromatograma (GC/MSD – modo SIM) do concentrado obtido a partir da análise do destilado obtido do líquido de conserva das salsichas, via SPE com CA em pó. Coluna HP-1 e padrão interno na concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$   
*Condições descritas na Tabela XI, página 58*



**Figura 53:** Cromatograma (GC/MSD – modo SIM) do concentrado obtido a partir da massa das salsichas, via SPE com CA em pó. Coluna HP-1 e padrão interno na concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$

*Condições descritas na Tabela XI, página 58*

#### 4.5.2.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS AMOSTRAS

A Tabela XL apresenta as concentrações da nitrosaminas encontradas nas amostras analisadas. Os resultados apresentam a média de pelo menos três determinações e os desvios padrões estão representados junto aos valores encontrados. Os limites estão de acordo com as exigências dos órgãos de controle internacionais<sup>37,42</sup>.

**Tabela XL:** Resultados obtidos para a análise quantitativa da amostra A usando SPE com CA em pó e GC/MSD

Analitos	%REC	%RSD	FC	Liq.Bruto	Liq. dest	Massa salsicha		LD*
				Conc*	Conc*	Conc*	VCor*	
DMN	48,9	8,52	1,9	nd	nd	nd	---	0,2
DEN	48,1	19,1	2,2	nd	nd	nd	---	0,1
NPIR	16,3	15,44	8,1	nd	0,36±0,01	0,28±0,01	2,27	0,2
NMOR	15,0	15,97	8,4	nd	0,28±0,01	nd	---	0,2
NPIP	50,3	35,69	2,2	0,63±0,01	0,23±0,01	0,35±0,01	0,77	0,2
DBN	24,6	36,97	3,8	nd	nd	nd	---	0,3

(\*) valores em  $\mu\text{g.kg}^{-1}$

REC Recuperação a partir de 150 g de amostras sólida fortificadas com  $200\mu\text{g kg}^{-1}$

VCor: Valor corrigido em função das recuperações FC: Fator de correção para a amostra sólida

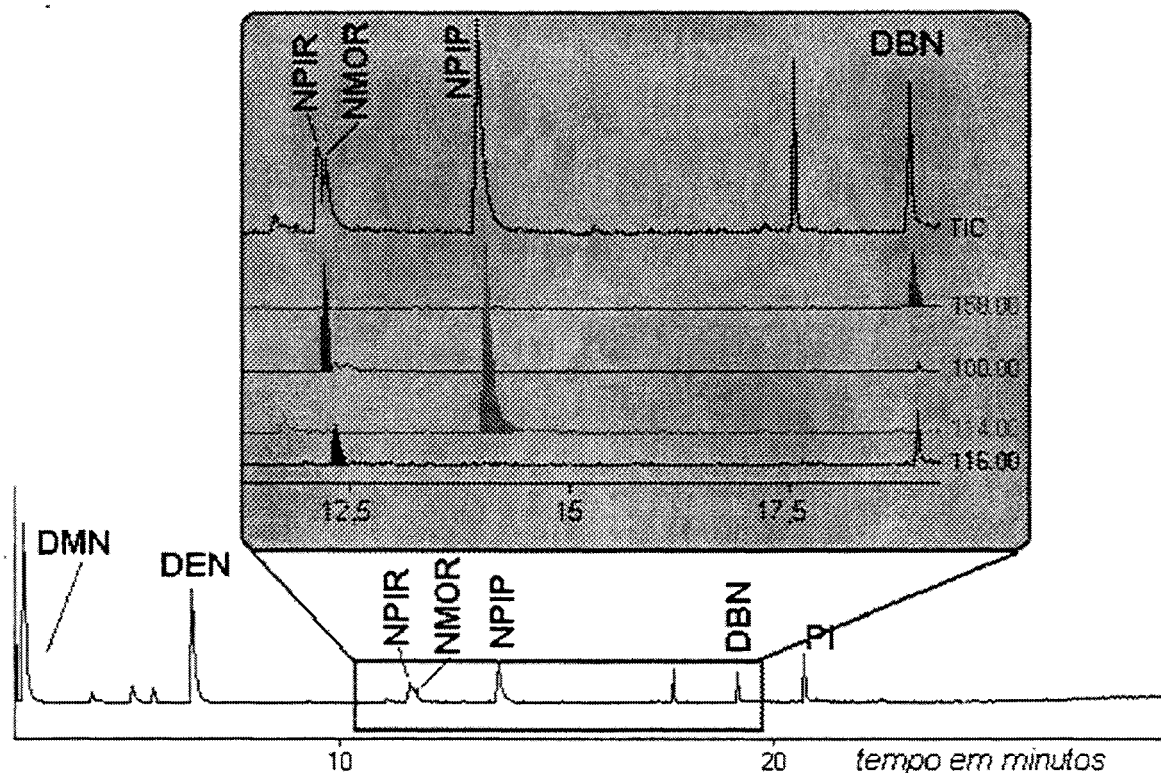
nd = não detectado, ou seja, ausente ou em concentração inferior ao limite de detecção do método

Como pode ser observado, os valores encontrados estão dentro de limites relativamente baixos, com maiores quantidades das nitrosaminas no líquido de conserva.

Os valores obtidos no líquido de conserva após a destilação indicam o valor de recuperação para o composto NPIP de 36,0 %. Porém os compostos foram detectados, na sua maioria somente no eluato de DCM, o que indica que os valores encontrados são menores do que os reais, indicando uma maior retenção na superfície do carvão.

#### 4.5.2.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS

As Figuras 54 e 55 apresentam os cromatogramas dos eluatos de acetona e de DCM obtidos a partir da pré-concentração de uma amostra fortificada com  $200\mu\text{g kg}^{-1}$  dos padrões de nitrosaminas. O eluato de acetona se apresenta bastante seletivo em relação aos analitos, enquanto que no eluato de DCM, tem-se um número muito maior de compostos, indicando sua seletividade.

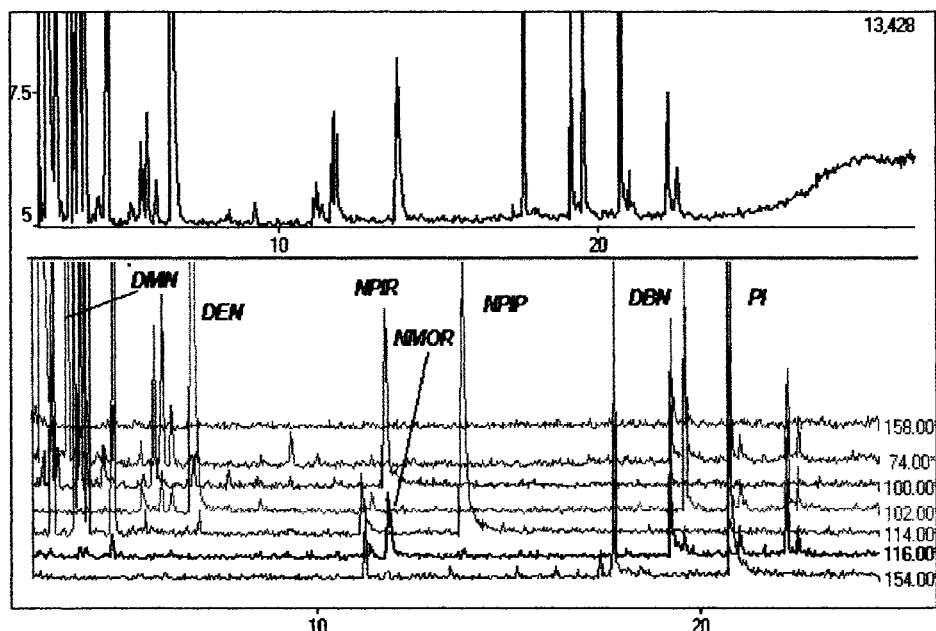


**Figura 54:** Cromatograma (GC/MSD – modo SIM) do concentrado obtido a partir do eluato de acetona de 150 g de massa das salsichas (amostra A) fortificada com  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ , via SPE com CA em pó. Coluna HP-1 e padrão interno na concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$

*Condições descritas na Tabela XI, página 58*

Em muitos casos, para amostras não fortificadas, foram detectados somente os analitos no eluato de DCM sendo que em algumas amostras nenhum analito foi detectado. O DCM tende a arrastar um maior número de compostos onde se destacam os lipídios presentes no tipo de amostras estudadas.

A metodologia utilizando carvão em pó apresentou-se com grandes variações nos valores de recuperação, e em alguns casos os compostos não foram detectados. A dificuldade de eluição dos compostos adsorvidos no carvão em pó é um dos fatores que afeta a variabilidade das recuperações.



**Figura 55:** Cromatograma (GC/MSD – modo SIM) do concentrado obtido a partir do eluato de DCM de 150 g de massa das salsichas (amostra A) fortificada com  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ , via SPE com CA em pó. Coluna HP-1 e padrão interno na concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$

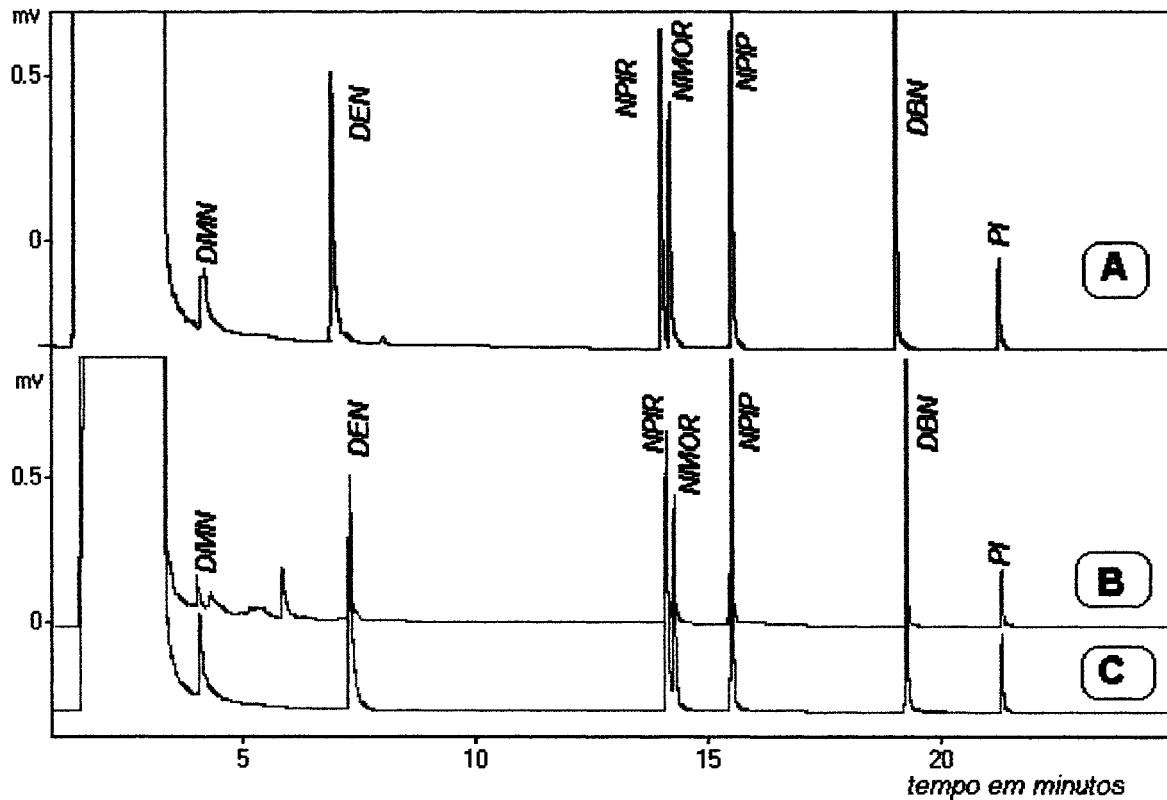
*Condições descritas na Tabela XI, página 58*

## 4.6 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS POR SPE COM CARVÃO ATIVO GRANULAR POR CROMATOGRÁFIA GASOSA

### 4.6.1 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO POR SPE/GC/FID COM CARVÃO ATIVO GRANULAR

Na Figura 56 está apresentada a comparação entre o cromatograma de uma mistura padrão a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  e os cromatogramas referentes aos eluatos de acetona resultantes do processo de pré-concentração de 200 mL de amostras aquosas sintéticas de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Através da comparação dos tempos de retenção observa-se a presença de todos os compostos confirmando a capacidade do método em detectar os compostos na faixa de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , que é exigido para análise de nitrosaminas<sup>42</sup>.





**Figura 56:** Comparação entre os cromatogramas (GC/FID) da solução padrão a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (A) e dos eluatos de acetona de soluções aquosas a  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (B) e  $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (C) submetidas ao processo de SPE com CA granular. Coluna HP-1 e padrão interno na concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . Condições descritas na Tabela XI, página 58

A Tabela XLI apresenta os parâmetros para caracterização do método SPE/GC/FID usando carvão ativo granular, obtidos através da construção de curvas de calibração a partir da pré-concentração de 200 mL de amostras sintéticas aquosas. Os resultados demonstram que o método apresenta uma relação linear para faixa de concentração de  $10$  a  $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (ppb). Observa-se que os limites de detecção atingem valores inferiores a  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

Observam-se variações bastante elevadas nos desvios padrão, porém estão dentro de valores aceitáveis quando se trabalha na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$  (ppb). O comportamento geral concorda com os valores obtidos para carvão ativo em pó, onde os maiores valores de recuperação foram obtidos para os compostos DEN, DBN, NPIP.

**Tabela XLI:** Características e equações das retas referentes a curvas de calibração para o método de SPE/GC/FID usando 1 g de carvão ativo granular e 200 mL de solução aquosa na concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> a 200 µg L<sup>-1</sup>

compostos	Áreas relativas para soluções em diferentes concentrações(µg L <sup>-1</sup> )										Equação da reta Y= bx + a			% REC*	%RSD	LD	LQ
	10	%RSD	30	%RSD	50	%RSD	100	%RSD	200	%RSD	a	b	r				
DMN	0,032	13,8	0,053	17,0	0,104	14,5	0,311	4,0	0,513	2,4	-0,0063±0,025	0,0027	0,9771	15,9	17,9	28,56	95,19
DEN	0,142	3,9	0,470	10,7	0,523	22,0	1,318	4,6	2,732	0,5	0,0288±0,021	0,0137	0,9937	44,8	26,3	4,60	15,33
NPIR	0,068	0,5	0,112	12,8	0,312	11,6	0,697	1,3	1,572	0,6	-0,0846±0,037	0,0082	0,994	31,9	17,9	13,54	45,12
NMOR	0,071	1,3	0,121	15,2	0,361	29,2	0,658	4,7	1,272	0,2	-0,0067±0,021	0,0065	0,9927	35,2	37,8	9,69	32,31
NPIP	0,273	9,5	0,797	1,9	0,999	15,6	1,811	2,5	3,448	0,5	-0,193±0,072	0,0163	0,9967	57,0	20,8	1,10	3,67
DBN	0,293	7,4	0,851	2,8	1,529	10,8	2,445	3,1	5,167	5,1	0,0946±0,043	0,0252	0,9957	76,0	32,7	5,17	17,22

a : coeficiente linear      b: Coeficiente angular      r: fator de correlação      LD e LQ: Limite de detecção e quantificação em µg L<sup>-1</sup>  
obs.: análises realizadas, pelo menos, em triplicata      REC\*: recuperações para uma solução a 50 µg L<sup>-1</sup>

Os demais compostos, em função da alta polaridade e, conseqüente forte interação com a matriz aquosa e perdas durante o processo, levam a recuperações mais baixas. Os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação mostram que os compostos com maiores valores de recuperação nas extrações e maiores fatores de resposta no equipamento GC/FID apresentam limites de detecção com valores mais baixos, como é o caso da NPIP e DBN. Já os compostos mais polares como a DMN NMOR e NPIR apresentam valores para os limites de detecção mais elevados

#### **4.6.1.2 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA SPE/GC/FID À MISTURA SINTÉTICA AQUOSA COM CARVÃO ATIVO GRANULAR – CÁLCULO DAS RECUPERAÇÕES DO PROCESSO**

Para avaliar a exatidão do processo de SPE com carvão granular foi preparada uma mistura sintética como indica a Tabela XLII. Para determinar um fator de calibração a ser usado nas amostras pré-concentradas, submeteram-se ao processo de pré-concentração, em paralelo 200 mL de uma mistura sintética e 200 mL de um padrão  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  (ppb). Uma vez que através do estudo da curva de calibração comprova-se a relação linear entre a concentração do analito e o sinal gerado no equipamento de análise, para faixa de concentração de trabalho, a concentração das misturas sintéticas foram calculadas utilizando este fator de calibração conforme a fórmula abaixo:

**Tabela XLII:** Estudo da exatidão do processo de SPE usando carvão granular e GC/FID

Composto	valor correto	valor encontrado	% RSD	erro absoluto	% erro relativo
DMN	50	56,3	19,5	+6,3	+12,4
DEN	50	40,1	20,0	-9,1	-18,2
NPIR	150	154,6	8,6	+4,6	+3,1
NMOR	100	124,9	9,2	+24,9	+4,9
NPIP	50	47,4	15,0	-2,6	-5,2
DBN	30	24,3	14,8	-5,7	-19,0

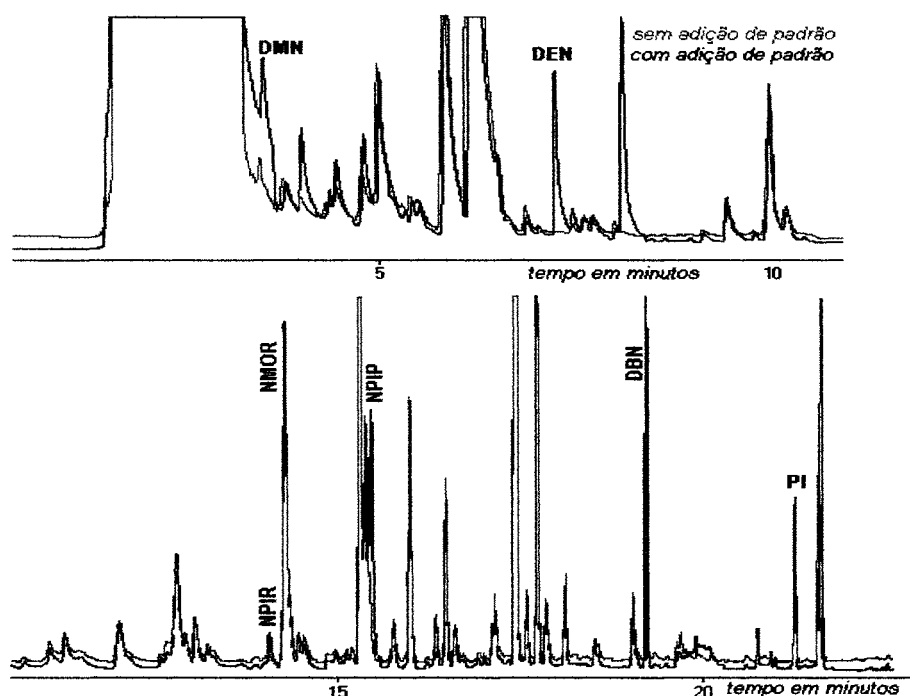
A utilização deste fator de calibração no cálculo das concentrações já considera todas as possíveis perdas durante o processo de SPE e representa um ganho de tempo de análise mantendo o erro em uma faixa aceitável para faixa de concentração estudada.

Os resultados concordam com os obtido por SPE/MEKC para o carvão granular. O uso do fator de calibração permitiu a determinação dos analitos com erros variando entre 3,1 – 24,9 %

#### 4.6.1.3 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE SPE COM CARVÃO ATIVO GRANULAR E GC/FID A AMOSTRAS REAIS

A Figura 57 apresenta a comparação entre os eluatos de acetona de uma amostra fortificada com 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  e da amostra sem adição de padrão. O aumento de área e a coincidência entre os tempos de retenção sugerem a presenças dos compostos DMN, NPIR, NMOR, NPIP.

A Tabela XLIII apresenta os dados relativos à análise quantitativa da amostra A (massa de salsicha de marca brasileira).



**Figura 57:** Comparação entre os cromatogramas dos eluatos de acetona obtidos por SPE com CA granular do destilado da massa de salsicha da amostra A com e sem adição de padrão, GC/FID. Coluna HP 1

obs: O cromatograma foi dividido em duas partes para melhor visualização dos picos  
Condições descritas na Tabela XI, página 58

**Tabela XLIII:** Análise quantitativa do extrato do destilado por arraste de vapor a vácuo da massa de salsicha da amostra A, obtido por SPE com carvão ativo granular e GC/FID

Compostos	% REC*	% RSD	Fator de correção	conc	Valor corrigido
DMN	51,7	30,2	1,9	13,9	26,4
DEN	38,3	17,8	2,6	nd	---
NPIR	13,5	40,8	7,4	1,1	8,14
NMOR	38,8	32,3	2,6	167,1	334,2
NPIP	65,7	37,3	1,5	12,4	27,9
DBN	72,3	7,8	3,7	0,5	1,85

nd = não detectado, ou seja, ausente ou em concentração inferior ao limite de detecção do método

(\*) recuperação a partir de amostras fortificadas com  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$

Conc: Concentração em  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  na massa da salsicha

Observa-se valores elevados para DMN o que pode ser em decorrência da coeluição de algum outro composto ou mesmo o próprio solvente uma vez que, no equipamento GC/FID as análises são feitas no modo splitless.

#### 4.6.2 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS POR SPE/GC/MSD COM CARVÃO ATIVO GRANULAR

##### 4.6.2.1 DESTILADO DA MASSA SALSICHA DA AMOSTRA A

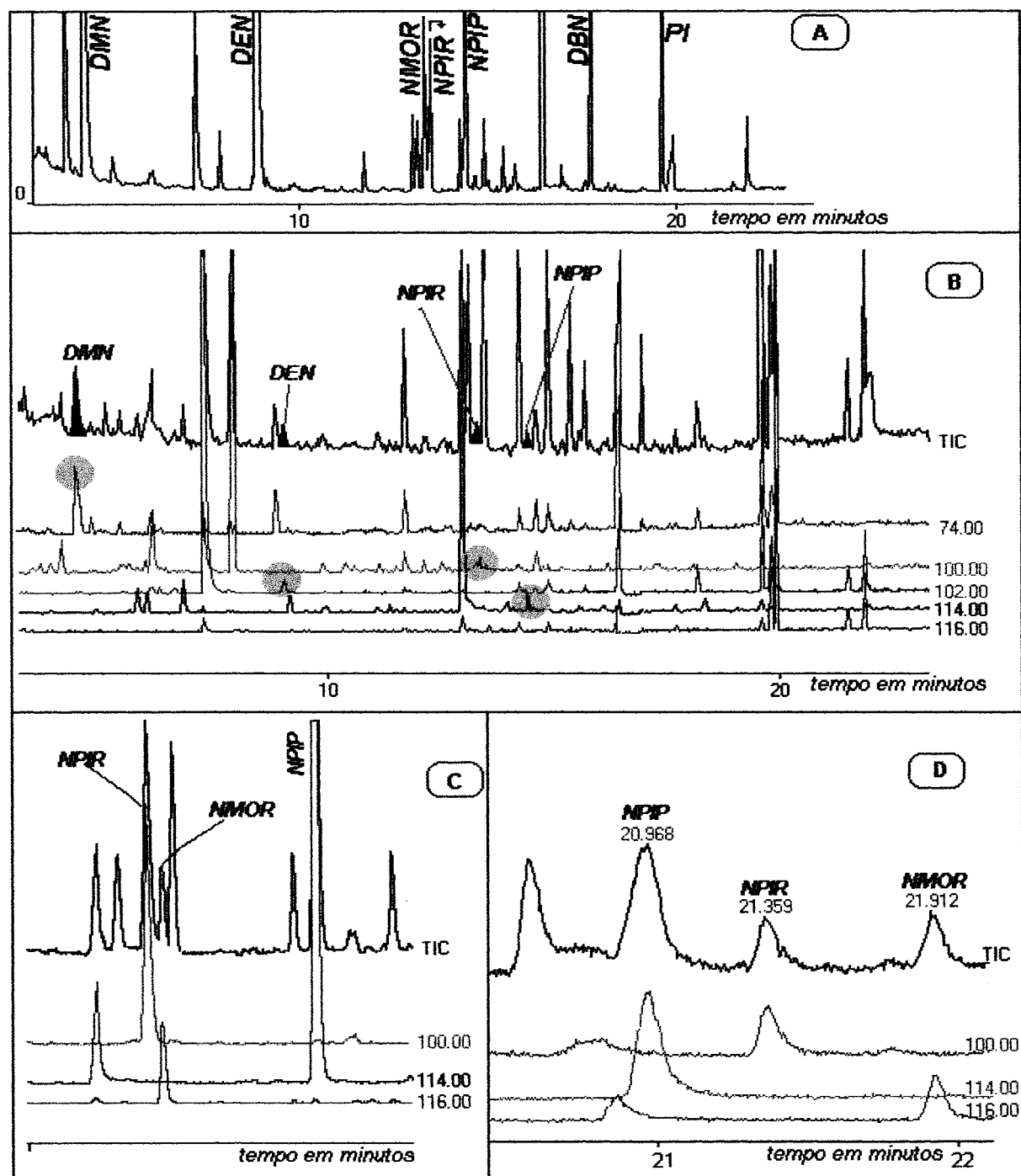
Os resultados obtidos através da aplicação da metodologia SPE/GC/MSD a amostras de destilado a vácuo por arraste de vapor da massa de salsicha da amostra A estão expressos na Tabela XLIV.

**Tabela XLIV:** Análise quantitativa do extrato do destilado por arraste de vapor a vácuo da massa de salsicha da amostra A, obtido por SPE com carvão ativo granular e GC/MSD

composto	% REC	% RSD	amostra não fortificada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	% RSD	Fator de correção	*Valor corrigido	LD $\mu\text{g kg}^{-1}$
DMN	38,4	23,3	1,49	9,5	2,6	3,87	0,2
DEN	47,3	16,4	0,96	6,0	2,1	2,01	0,1
NPIR	10,9	34,8	1,08	12,0	9,1	9,83	0,1
NMOR	25,2	13,9	0,17	15,9	4,0	0,68	0,1
NPIP	38,6	12,5	2,0	11,1	2,6	5,2	0,1
DBN	61,7	15,2	nd	---	1,6	---	0,1

*nd = não detectado, ou seja, ausente ou em concentração inferior ao limite de detecção do método*  
*LDs calculados considerando 3 vezes o valor da área média do ruído obtido a partir de um branco de toda metodologia. \* Concentração em  $\mu\text{g kg}^{-1}$*

A combinação dos tempos de retenção em diferentes fases estacionárias e dos espectros de massa com o estudo de amostras adicionadas, permitiu comprovar a presença dos compostos DMN, DEN, NPIR, NMOR e NPIP. A Figura 58 ilustra esta combinação, nela aparece um cromatograma de um eluato de acetona referente a amostra A sem adição de padrão em coluna HP-1 (58 B) e Carbowax 20M (58 D) e com adição de  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  de padrões com coluna HP-1 (58 A e 58 C).



**Figura 58:** Cromatogramas (GC/MSD) do eluato de acetona obtido pela aplicação da SPE com CA granular do destilado da amostra A: (A) fortificada com  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  e usando coluna HP1; (B) sem marcar também usando coluna HP1; (C) Zoom da Figura 60A e (D) Zoom da amostra sem marcar analisada em coluna Carbowax 20M Condições descritas na Tabela XI, página 58

As Figuras 58 C e 58 D correspondem ao “Zoom” dos respectivos cromatogramas, enfatizando a região em que aparecem os compostos de interesse. A utilização do modo SIM gerou cromatogramas com menor número de picos eliminando a interferência de alguns compostos sobre a NPIR, NMOR e NPIP que ocorria em SPE/GC/FID. Os valores de recuperação apresentados na Tabela XLIV seguem o mesmo comportamento detectado por SPE/GC/FID. A combinação das análises feitas nas colunas HP1 e Carbowax 20 permitiu uma confirmação adicional da presença dos compostos pela mudança nos tempos e na ordem de eluição dos compostos NPIP, NPIR e NMOR conforme se observa na Figura 60 D.

A seletividade desta técnica permite constatar que os resultados obtidos por GC/FID para a DBN tratavam-se de um falso positivo, pois a mesma não foi confirmada por GC/MSD.

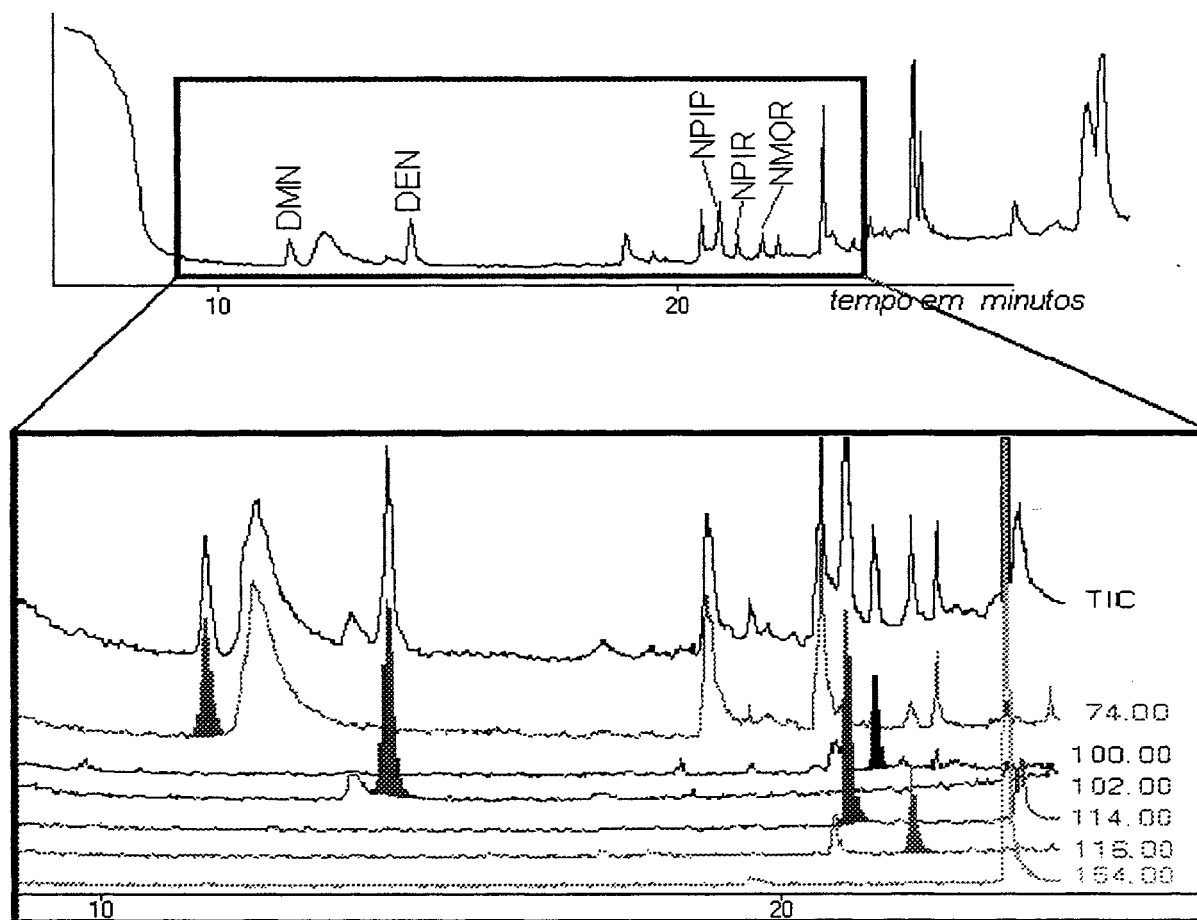
#### **4.6.2.2 LÍQUIDO DE CONSERVA DESTILADO - AMOSTRA A**

Os resultados quantitativos obtidos através da aplicação da metodologia SPE/GC/MSD a amostras de destilado a vácuo por arraste de vapor do líquido de conserva estão expressos na Tabela XLV. A combinação dos tempos de retenção em diferentes fases estacionárias, espectros de massa com o estudo de amostras fortificadas, permitiu comprovar a presença dos compostos DMN, DEN, NPIR, NMOR e NPIP. A Figura 59 apresenta o eluato de acetona para uma amostra fortificada analisada em uma coluna Carbowax 20M enquanto a Figura 60 apresenta um detalhe de um cromatograma para o eluato de acetona obtido para coluna HP1 no qual se observa a inversão da ordem de eluição para os compostos NPIP, NMOR, e NPIR em relação a Figura 59



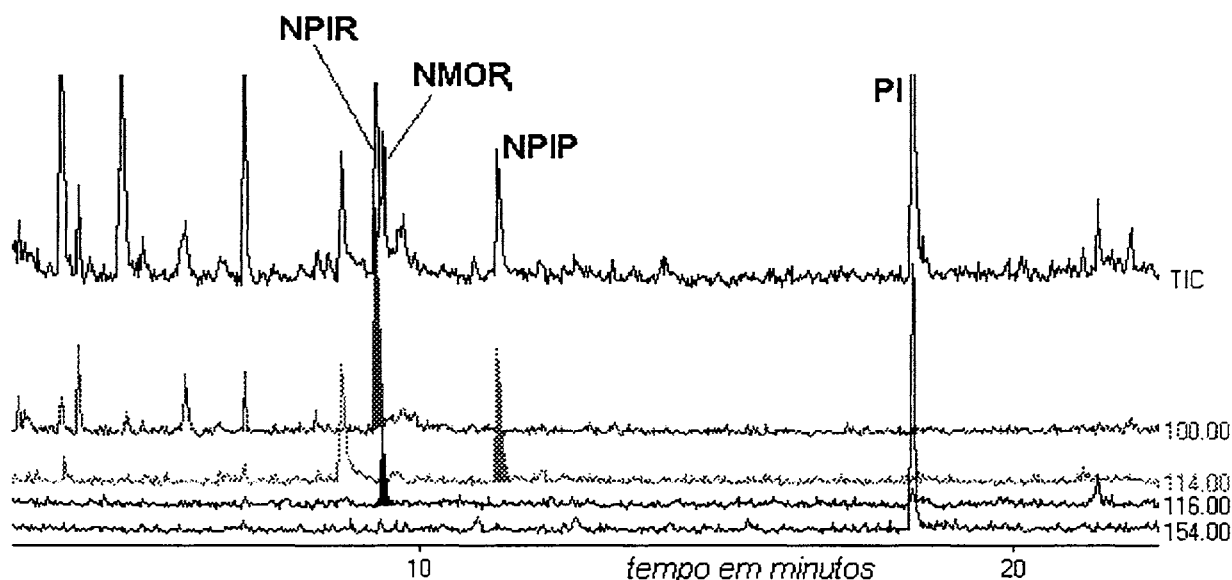
**Tabela XLV:** Resultados da análise quantitativa do eluato de acetona do líquido de conserva destilado da amostra A obtido por SPE com carvão ativo granular e analisado por GC/MSD

Compostos	% REC	%RSD	F <sub>cor</sub>	Amostra	%RSD	Valor corrigido µg kg <sup>-1</sup>
DMN	51,3	15,4	1,9	0,57	5,0	1,1
DEN	63,4	12,8	1,6	nd		
NPIR	20,9	23,0	4,8	16,9	2,1	81,12
NMOR	40,7	17,2	2,4	2,9	2,8	7,0
NPIP	45,2	21,0	2,2	14,8	2,2	32,6
DBN	80,4	8,9	1,2	nd		



**Figura 59:** Cromatograma GC/MSD para o eluato de acetona do líquido de conserva destilado da amostra A obtido por SPE com CA granular usando Coluna Carbowax 20M

Condições descritas na Tabela XI, página 58



**Figura 60:** Cromatograma GC/MSD para o eluato de acetona do líquido de conserva destilado da amostra A obtido por SPE com CA granular usando Coluna HP-1  
*Condições descritas na Tabela XI, página 58*

Os valores apresentados na Tabela XLV revelam a presença de nitrosaminas em apreciáveis concentrações no líquido de conserva o que indica uma certa toxicidade do produto, excedendo aos limites toleráveis na legislação internacional.

Destaca-se nas amostras a presença do compostos NPIR, característico de produtos cárnicos desta natureza. Sua origem está ligada ao aminoácido prolina<sup>37</sup>. Os compostos DEN e DMN pode também derivar de aminoácidos como glicina e valina, já a NPIP pode estar relacionada com a piperidina, composto presente na pimenta utilizada como condimento<sup>117</sup>.

A NMOR tem sido descrita na literatura como ocorrência esporádica em alimentos<sup>2</sup>. Especula-se a possibilidade da presença deste composto estar relacionada à presença da morfina utilizada como inibidor de corrosão para aquecedores de água, ou em outros equipamentos, inclusive embalagens. O que pode sugerir que a presença no produto cárnico resulte da contaminação externa e não por geração do composto a partir de precursores existentes na amostra.

## *5 - CONCLUSÕES*

---

A análise dos dados e resultados apresentados e discutidos neste trabalho permite que sejam elaboradas as seguintes conclusões:

### **5.1 QUANTO ÀS METODOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO**

O método de extração por arraste de vapor mostrou-se eficiente para extrair os analitos a partir de produtos cárnicos, sendo barato e estando disponível na maioria dos laboratórios de análise (rotavapor simples).

A extração líquido-líquido não se apresentou adequada à extração das nitrosaminas com baixa repetibilidade e baixa recuperação, exigindo reduções de volume da ordem de microlitros impossibilitada pela falta do equipamento necessário.

A SPE mostrou melhor desempenho, especialmente na metodologia com carvão ativo granular, sendo rápido, com boa repetibilidade, econômico, e simples podendo ser aplicável em amostras aquosas tanto na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$  como para  $\text{mg L}^{-1}$ .

Chama-se a atenção que este adsorvente pode ser utilizado não só com objetivo de pré-concentração para análise de nitrosaminas, mas também bem como um adsorvente em filtros com objetivo de eliminar estes compostos em efluentes aquosos visando reduzir sua distribuição no ambiente.

Quanto à utilização do CA granular para procedimentos analíticos, a possibilidade do acoplamento em série de unidades de CA, pode incrementar ainda mais as recuperações embora os valores de recuperações apresentados neste trabalho estejam dentro da faixa descrita pelo método oficial que em programas inter-laboratoriais admite valores da ordem de 13 a 109 % para DMN, 45 a 146% para DPN<sup>53</sup>, considerando amostras marcadas com  $20\mu\text{g L}^{-1}$ .

A metodologia de extração por arraste de vapor a vácuo combinada à SPE apresenta a possibilidade de ser adaptada a diferentes extratos aquosos, variando a massa de adsorvente e o volume de amostra conforme as necessidades analíticas, sendo facilmente exequível pelo técnico de laboratório.

## 5.2 QUANTO A TÉCNICA DE DETECÇÃO

O método eletroforético apresentou-se adequado à separação dos analitos, porém alterações na parede do capilar com resíduos de amostras levam à modificação do potencial Zeta e alterações dos tempos de migração, exigindo um cuidado especial na limpeza entre uma análise eletroforética e outra. Esta variação nos tempos de migração associada à falta de seletividade da detecção espectrofotométrica, dificulta a identificação segura dos compostos, no caso de amostras reais aquosas. Por outro lado a detecção espectrofotométrica apresentou os melhores limites de detecção quando combinadas ao processo de SPE com CA granular, salientando o fato que as amostra para análise por MEKC foram diluídas a

5mL. Logo, uma redução neste volume levará a um incremento considerável na sensibilidade do método. Isto faz com que a metodologia analítica seja considerada como viável para análise de amostras com matrizes não muito complexas quando já se conhecem quais compostos estão presentes. Desta forma, o método pode ser utilizado como método de controle quantitativo.

A técnica GC/FID carece de seletividade porém a metodologia combinando SPE/GC/MSD no modo SIM apresentou a sensibilidade e seletividade necessárias para análise de nitrosaminas, atingindo limites de detecção abaixo de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Desta forma, este procedimento foi considerado o ideal para a análise destes analitos, tanto em amostras aquosas como nos produtos cárnicos estudados.

### 5.3 QUANTO ÀS AMOSTRAS ESTUDADAS

A metodologia (extração com arraste de vapor a vácuo, SPE com CA granular, análise por GC/MSD) permitiu a identificação e quantificação das nitrosaminas, DMN, DEN, NMOR, NPIR e NPIP em produtos cárnicos.

No caso da análise do líquido de conserva o processo de destilação a vácuo mostrou-se essencial, uma vez que análise direta desta amostra (sem destilação) apresentou uma queda nas recuperações não permitindo a detecção dos compostos. A elevada viscosidade da amostra também dificultou o processo de SPE tanto com carvão ativo em pó como granular.

Embora a metodologia tenha permitido detectar as nitrosaminas acima citadas, outras podem estar presentes, e, mesmo que a análise tenha revelado que o valor individual de cada analito esteja abaixo do valor permitido ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ), a soma da concentração dos compostos pode superar o valor tolerado, sendo mais ou menos prejudicial de acordo com o tipo de nitrosamina presente.

A metodologia desenvolvida exige um analista cuidadoso pois as operações de laboratório, mesmo que simples, são de extrema importância. A limpeza do material (vidraria, solventes, adsorventes), a manutenção da baixa temperatura nos processos de coleta do analito (na extração com arraste de vapor), troca de solvente

e concentração de extratos e, ainda, a reduzida exposição a luz (UV) são importantes cuidados para garantir boas recuperações.

Sendo um trabalho de doutorado investigaram-se-se algumas questões e algumas possibilidades de análise de nitrosaminas, abrindo caminhos para novos trabalhos. A metodologia não é fechada e sim um sistema a ser otimizado para cada situação amostra/analito.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Charpentier, S., *The Ecologist*, **2001**, Abril, 54.
2. Ikeda, K.; Migliorese, K. G.; *J. Soc. cosmetic. Chem*, **1990**. 41, 283.
3. Crosby, D. G.; *Environmental Toxicology and Chemistry*; Oxford University Press; New York; 1998.
4. Morrison, R.; Boyd, R.; *Química Orgânica*; Fundação Calouste Gulbenkian; Lisboa; 1994.
5. Telling, G. M; The Determination of N-nitrosamines in foods and Cosmetics; *Trends Anal. Chem.*, **1982**, vol. 1,12, 277.
6. Borghesani, G.; Locatelli, V. L.; *Annali di Chimica*. **1983**, 73, 137.
7. Levallois, P.; Ayotte, P.; Van Maanen, J. M. S.; Desrsier, T.; Gingras, S.; Dallinga, J. W.; Vermeer, I. T. M.; Zee, J.; Poirier, G.; *Food chem. Toxicol.* **2000**, 38, 1013.
8. Vermeer, I. T. M.; Moonem, E.J.C.; Dallinga, J.W.; Kleinjans, J.C.S.; Maanen, J. M. S.; *Mutat. Res.* **1999**, 428, 353.

9. Zhu, J. H.; Yan, D.; Xai, J.R.; Ma L. L.; Shen, B.; *Chemosfere*, **2001**, *44*, 949.
10. Spiegelhalder, B.; Preussman, R.; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **1984**, *108*, 160.
11. Hedler L.; Schurr, L., C.; Marquardt, P.; *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **1979**, *56*, 681.
12. Fishbein, L.; *Sci. of Total Environm.*, **1979**, *13*, 157.
13. Goicolea, M. A.; Balugera, Z. G.; Portela, M. J.; Barrio, R. *J Anal. Chim. Acta*, **1995**, *305*, 310.
14. Castegnaro, M.; Pignatelli, B.; Walker, E. A.; *Fed. Cosmet. Toxicol.*, **1981**, *19*, 489.
15. Gough, T. A.; *The Analyst*, **1978**, *103*, 785.
16. Dawson, B. A.; Lawrence, R. C.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1987**, *70(5)*, 554.
17. Cooper, S. F.; Lemoyne, C.; Gauvreau, D.; *J. Anal. Toxicol.*, **1987**, *11*, 12.
18. Monarca, S.; Feretti, D.; Zanardini, A.; Moretti, M.; Villarini, M.; Spiegelharder, B.; Zerbine, I.; Gelatti, U.; Lebbolo, E.; *Mutat. Res.*, **2001**, *490*, 159.
19. Fiddler, W.; Pensabene, J.W.; Doerr, R. C.; Wasserman, A. E.; *Nature*, **1972**, *236*, 307.
20. Ozdemir, M.; Yasar, Y.; *J. Eng. & Environm*, **1987**, *11(2)*, 273.
21. Cooper, C. V.; *J. Am. Ind. Hyg. Assoc.*, **1987**, *48*, 265.
22. Fan, T. Y.; Fine, D.H.; *J. Agric. Food Chem.*, **1978**, *26(6)*, 1471.
23. Fan, T. Y.; Morrison, J.; Rounbehler, D. P.; Ross, R.; Fine, D. H.; *Science*, **1977**, *196*, 70.
24. Pensabene, J. W.; Wasserman, A. E.; *Fed. Cosmet. Toxicol.*, **1980**, *18*, 329.
25. Havery, D. C.; Fazio, T.; *Fed. Cosmet. Toxicol.*, **1982**, *20*, 939.
26. Gray, J. I.; Stachiw, J.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1987**, *70(1)*, 64.
27. Collier, S. W.; Milstein, S. R.; Orth, D. S.; Jayasimhula, K.; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **1988**, *39(6)*, 329.
28. Schwarzenbach, R.; Schmid, J. P.; *J. Chromatogr.*, **1989**, *472(1)*, 231.
29. Sen, N. P.; Seaman, S.W.; Kushwaha, S. C.; *J. Chromatogr.*, **1989**, *463(2)*, 419.
30. Andúgar, F. R.; Garrigós, M. C.; Marin, M. L.; Cantó, A.; Jiménez, A.; *J. Chromatogr A*, **2002**, in press.
31. Matyska, M. T.; Pesek, J. P.; Yang, L.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, *887*, 497.



32. Proksch, E.; *Int. J. Hygiene and Environ. Health*, **2001**, Vol 204, issue 2-3, 103.
33. Liener, I.; E. "Toxic Constituents of Animal Foodstuffs", Ed Academic Press, New York/London, 1974.
34. Glória, M. B. A.; Barbour, J. F.; Scanlan, R. A.; *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45 (5), 1816.
35. Mitacek, E.J.; Brunnemann, K. D.; Suttajit, M.; Martin, N.; Limasila, T.; Ohshima, H.; Caplan, L. S.; *Food Chem Toxicol.*, **1999**, 37, 297.
36. Reynolds, C. A.; Thomson, C.; Initio, A. B.; *J. Mol. Struct*, **1987**, 149, 345.
37. IARC *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans - Some N-nitroso Compounds*, Vol 17, IARC, Lyon, Maio, 1978.
38. Baird, C.; *Environmental Chemistry*, W.H. Freeman & Company, New York, 1995.
39. Lou, Q.; Hwang, K. W.; Liu, X. Z.; Sahi, C.; Bohn, R. K.; Bock, C. W.; *J. Mol. Struct.*, **1998**, 445, 117.
40. Ranken M.D.; *Manual de Industrias de los alimentos*, Acribia, S.A, Zaragoza, Espanha, 1993, p27
41. Drescher, G.S. Frank, C.W. *Anal. Chem.*, **1978**, 50(14), 2118.
42. Maxwell, R. J.; Pensabene, J.W.; Fiddler, W.; *J. of Chromatogr. Sci.*, **1993**, 31, 212.
43. Subramanian, G.; *Quality Assurance in Environmental monitoring – Instrumental Methods*", VCH New York, 1995.
44. Parees, D. M.; *Anal. Chem.*, **1979**, 51(1), 1675.
45. Cox, R.D.; Frank, C. W.; Nikollaisen, L.D.; Caputo, R.E.; *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 253.
46. Marano, R. S.; Updegrove R. C.; Machen, W.S; *Anal. Chem.*, **1982**, 54(12), 2157.
47. Arrendal R.F.; Chamerlain, W. J.; Chortyk, O. T.; Baker, J. L.; *Anal. Chem.*, **1986**, 58(3), 565.
48. Oliveira, E. C.; "Aplicação da Extração em Fase Sólida na Pré-Concentração de Compostos Fenólicos Clorados em Efluentes de Branqueamento de celulose", *Tese de Mestrado*, Instituto de Química, UFRGS, (1999).

49. Sen, N. P.; in IARC (Edt), Bogovsk, P.; Preumann, R.; Davis, E. A.; IARC, Lyon, 1972, p25..
50. Wasserman A. E.; in IARC (Edt), Bogovsk, P.; Preumann, R.; Davis, E. A.; IARC, Lyon, 1972, p10.
51. Crosby, N. T. ; Foreman, J. K.; Paleraman, J. F. ; Sawyer, R.; in IARC, Edt, Bogovsk, P.; Preumann, R. ; Davis, E.A.; IARC, Lyon, 1972 p38..
52. Telling, G.M.; Bryce, T.A.; Althorpe, J.; *J. Agric Food Chem.* **1971**, *19*, 937.
53. <http://www.epa.gov/epahome/index/nameindx3.htm>, US-EPA, Método 8070A, *Nitrosamines by GC* , SW-846 Ch 4.3.1.
54. Pawlishyn, J.; *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*; Wiley-VCH, New York , 1997.
55. Louch, D.; Motlagh, S.; Pawlishszyn, J.; *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1187.
56. Sen, N.P.; Seaman, S. W. ; Page, B. D.; *J. Chromatogr. A*, **1997**, *788*, 131.
57. Chester, T.L.; Pinkinson, J.D.; Raynie, D.E.; *Anal. Chem*, **1998**, *70 (12)*, 301R.
58. Taylor, L. T.; *Supercritical Fluid Extraction - Techniques in Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons Inc, New York; 1996.
59. Luque de Castro, M. D.; Valcárcel, M.; Tena, M. T.; *Analytical Supercritical Fluid Extraction*; Springer; Heidelberg, 1994.
60. Chester, T. L.; Pinkston, J. D.; Rayne, E.; *Anal. Chem.*, **1994**, *66(12)*, 106R.
61. Propkocznyk B.; Wu, W.; Cox, J. E.; Amin, S.; Desai, D.; Idris, A.M.; Hoffmann, D.; *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, *43(4)*, 916.
62. Ibáñez, E.; Lopes-Sebastián, S.; Ramos, E.; Tabera, J.; Reglero, G.; *J. Agric, Food Chem.*, **1997** *45(10)*, 3940.
63. Issaq, H. J.; Mangino, M.; Singer, G.; Wilbur D. J.; Risser, N.H.; *Anal. Chem.*, **1979**, *51(13)*, 2157.
64. Arrendal, R.F. ; Chamerlain, W. J.; Chortyk, O. T. ; Baker, J. L. ; *Anal. Chem.*, **1986**, *58(3)*, 565.
65. Rounbehler , D. P.; Reisch, J. W.; Coombs, J. R.; Fine, D. H. ; *Anal. Chem.*, **1980**, *52(2)*, 273.
66. Fu, C.; Xu, H.; *Analyst*, **1995**, *120*, 1147.

67. Cárdenes, L.; Ayala, J. H.; Gonzales, V.; Afonso, A. M., *J. Chromatogr. A*, **2002**, 946, 133.
68. Kirk - Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol 15, John Wiley & Sons, New York, 1981. p 988 .
69. Noll, K. E.; Gounaris, V.; Hou, W.-S.; *Adsorption Technology for Air and Water Pollution Control*, Lewis Publishers Inc. 1992.
70. Namiesnik, J.; Górecki, T.; Biziuk, M.; *Anal. Chim. Acta* .**1990**, 237, 1.
71. Khavkin, J.A.; Khavkine, M.J.; *Analytical Letters*, **1998**, 31(2), 355
72. Martin, R. J.; Shackleton, R. C.; *Water Res.*, **1990**, 24 (4), 477.
73. Kirk - Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol 4 pg 561-569, 3ª ed, Ed John Wiley & Sons, New York, (1981).
74. Haist-Gulde, B.; Baldauf, G.; Brauch H. -J.; in *The Handbook of Environmental Chemistry*, vol5, ed Hutzinger, O.; Springer, 1995. p 103.
75. Apostila - “Curso de Especialização em Projetos de Tratamento de Resíduos Industriais: Sólidos, Líquidos e Gasosos”, Departamento de Engenharia Química, PUCRS, Dezembro, 1997).
76. Onodera, S.; Nagatsuka, A.; Rokuhara, T.; Asakura, T.; Hirayama, N.; Suzuki, S.; *J. of Chromat.*, **1993**, 642, 185.
77. Aiken, G. R.; Thurman, E. M.; Malcolm, R. L.; Walton, H. F.; *Anal. Chem.*, **1979**, 51(11), 1799.
78. Parrish, J. R, *Anal. Chem.*, **1977**, 49 (8), 1189.
79. Renberg, L.; *Anal. Chem.* **1978**, 50 (13), 1836.
80. Lara, R. B.; Thomas, D. N.; *Anal. Chem*, **1994**, 66 (15), 2417,.
81. Pissolatto, T. M.; “*Desenvolvimento de Metodologia Analítica para a Determinação de Compostos Orgânicos, por Cromatografia Gasosa Utilizando Extração em Fase Sólida*”, Tese de Doutorado, PPGEM, Escola de Engenharia, UFRGS, Porto Alegre, RS, (1997).
82. Caramão, E. B.; Furtado J. L. F.; Peralba, M. C. R.; Zini, C. A.; Pissolatto, T. M.; *J. Microcolumn Separations*, **1995**, 7(6), 611.

83. Pissolatto, T. M.; Caramão, E. B.; Martins, A. F.; *J. Microcolumn Separations*, **1996**, 8(1), 5.
84. Pissolatto, T.M.; Schossler, P. ; Geller, A.M. ; Caramão, E.B. ; Martins, A. F.; *J. High Resolution Chromatography and Chromatographic Communications*, **1996**, 19, 577.
85. Nascimento Fº, I. Estudo de Compostos Orgânicos em Lixiviados de Aterros Sanitários, Tese doutorado, PPGQ, Instituto de Química, UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.
86. Saraullo, A.; Martos, P.A.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 1992.
87. Grote, C.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.*, 1997, 69(4), 587.
88. Jinno, K.; Muramatsu, T.; Saito, Y.; Kiso, Y.; Magdic, S.; Pawliszyn, J.; *J. of Chromat*, **1996**, 754, 137.
89. Möder, M.; Peter, P.; Pawliszyn, J.; *J. Microcolumn Separations*, **1998**, 10(2), 225.
90. Lee, M-R.; Lee, R-J.; Lin, Y-W.; Chen, C-M.; Hwang, B.-H.; *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 1963.
91. Cases, M. V.; . Hens, A. G; *Técnicas Analíticas de Separación*, cap 15 a 18, Reverté, Barcelona, 1990.
92. Greg, S. J.; Sing, K. S.; *Adsorption, Surface Area and Porosity*, Academic Press, London, 1982.
93. Sanches Filho, P. J.; Aplicação da Cromatografia Líquida Preparativa ao Estudo de Compostos Nitrogenados em Alcatrões de Carvão e Óleo de Xisto”, Tese de Mestrado, PPGQ/UFRGS, 1997.
94. Fox, J.B.Jr.; *Anal. Chem.* **1979**, 51 (9), 1493.
95. Pérez, E. L.; Análisis de alimentos Líquidos e Sólidos Mediante Sistemas automáticos Contínuos, Tese Doutorado, UCO, Córdoba Espanha, Novembro 2000.
96. Tomkins, B. A.; Griest, W. H.; *Anal. Chem.*, **1996**, 68(15), 2533.
97. Fine, D. H.; Rufed, F.; Rounbehler, D. P.; *Anal. Chem.*, **1975**, 47(7), 1188.

98. Gough T.A.; Webb, K. S.; Pringuer, M. A.; Wood, B. J.; *J. Agric. Food Chem.*, **1977**, 25(3), 664.
99. Opsal, R. B.; Reilly J. P.; *Anal. Chem.*, **1986**, 58(14), 2919.
100. Dabek-Zlotorynska, E.; *Electrophoresis*, **1997**, 18, 2453.
101. Ding, W.; Fritz, J.S.; *Anal Chem.*, **1997**, 69, 1593.
102. Knox, J. H. ; *J. Chromatogr., A*, **1994**, 680, 3.
103. Introduction to Capillar Eletrophoresis/Beckman Instrument- California-1991
104. Altria K. D.; *J. Chromatogr A*, **1999**, 856, 443.
105. Altria, K. D.; *Capillary Electrophoresis Guidebook, Principles, Operation and Applications*, vol 52, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 1996.
106. Blanco, C. C.; *Electrophoresis Capilar-*, Universidade de Almeria, servicio de Publicaciones- Almeria, 1998.
107. McKillop, A.G.; Smith, R. M.; Rowe, R. C.; Wren, S.A.C, *Anal Chem.*, **1999**, 71, 497.
108. Weinberger R., *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press. Inc., cap 2, 1993, p17.
109. Skoog, D.A.; Leary J.J.; *Analisi Instrumental*, cap 27, McGraw Hill, Madrid, 1994, p 785
110. Kitagishi K.; In *HandBook Capillkary Electrophoresis Applications*; H. Shintani, J. Polonský, Ed Blackie Academic & Professional, London, 1997, p17.
111. Bocek; P. Vespalec; R.; Giese; R. W.; *Anal. Chem*, **2000**,1, 587.
112. Turiel, E.; Fernández, P.; Pérez-Conde, C., Cámara, C.; *Analyst*, **1996**, 125, 1725.
113. Altria, K D.; Kelly, T.; Clark, B.; *LC.GC International-* **1996**, July, 408.
114. S. Terabe, *Micellar Electrokinetic Chromatography*, Beckman Instruments Inc, 1993.
115. Ng, C. L.; Ong, C. P.; Lee H. K.; Li, S. F. Y.; *J. Chromatogr. Sci.* **1994**, 32, 121.
116. Fine, D. H.; Ross, R.; Rounbehler, D. P.; Silvergleid, A.; Song, L.; *J. Agric Food Chem.*, **1976**, 24 (5), 1069.

117. Shenoy, N. R.; Choughuley, A. S. U.; Bhattacharua, R. K.; *J. Agric Food Chem.*; **1992**, *40*, 2211.

## *7 - PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS*

---

---

Propõe-se como atividades futuras decorrentes deste trabalho:

- ✓ Aplicação da metodologia proposta a diferentes amostras que apresentem as mesmas características (produtos cárnicos tratados com nitrito);
- ✓ Estudos preliminares os quais não foram apresentados neste trabalho, mostraram que a extração com fluido Supercrítico apresenta-se favorável a extração de nitrosaminas. A otimização de condições para extração destes composto a partir de amostras de produtos cárnicos bem como o estudo de traps úmidos (soluções aquosas ou solventes adequados) apresenta-se como um campo a ser explorado;
- ✓ Em função da falta de seletividade do detector utilizado em MEKC, estudos em equipamentos CE-MSD poderiam ser conduzidos permitindo assim resultados mais seguros;

- ✓ Estudos de derivatizantes fluorescentes para aumentar a sensibilidade do método em análise por MEKC;
- ✓ Quanto ao processo de SPE, outros sistemas de adsorvente/eluente podem ser investigados, bem como a possibilidade de dessorção dos analito através do equipamento ASE (Extração Acelerada por Solvente) ou por SFE (Extração com fluido supercrítico);
- ✓ Estudo de derivatizantes, para que através dos deslocamentos dos tempos de retenção do derivado em relação ao analito tenha-se mais uma evidência na identificação por GC/FID.



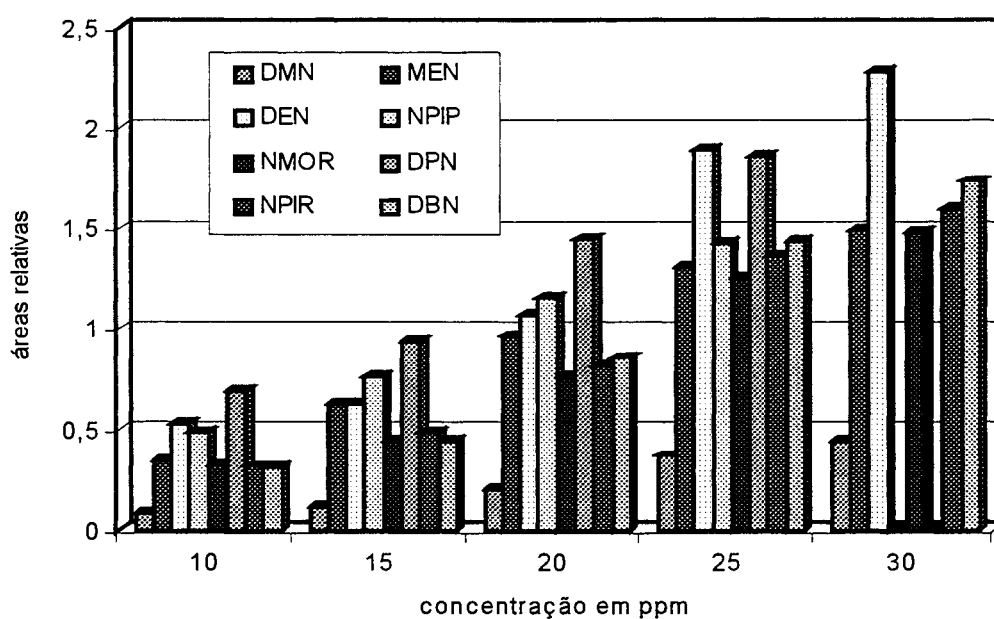
*8 - ANEXOS*

---

---

## 8.1 ANEXO I: DETERMINAÇÃO DA LINEARIDADE PARA O SISTEMA GC/FID NA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS NITROSAMINAS

A Figura I-1 apresenta as retas correspondentes à variação da área relativa (AR) de cada composto com a sua concentração, para cada um dos padrões estudados, e a Figura I-2 apresenta o gráfico de variação da resposta do detector (AR) com a concentração para todos os analitos, a título de comparação.

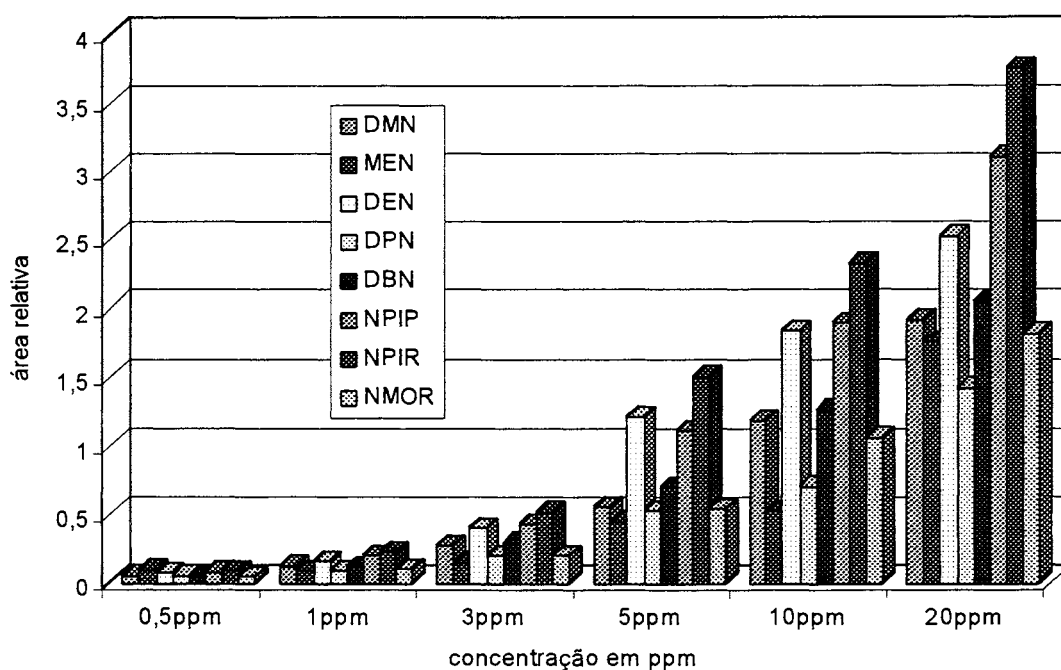


**Figura I-2:** Variação da AR com a concentração para as oito nitrosaminas estudadas, na faixa de 10 a 30 mg L<sup>-1</sup> (valores obtidos via GC/FID)



## 8.2. ANEXO II: DETERMINAÇÃO DA LINEARIDADE PARA O SISTEMA GC/MSD NA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS NITROSAMINAS

A Figura II-1 apresenta as retas correspondentes à variação da área relativa (AR) de cada composto com a sua concentração, para cada um dos padrões estudados, e a Figura II-2 apresenta o gráfico de variação da resposta do detector (AR) com a concentração para todos os analitos, a título de comparação.



**Figura II-2:** Variação da AR com a concentração para as oito nitrosaminas estudadas, na faixa de 10 a 20 mg L<sup>-1</sup> (valores obtidos via GC/MSD-modo SIM)



### 8.3 ANEXO III: ESTUDO DE NITROSAMINAS POR ABSORÇÃO MOLECULAR NO UV-vis

**Equipamento utilizado:** Espectrofotômetro DAD 8453

**Procedimento:**

A partir dos padrões DMN, DEN, NPIR, DBN, NPIP e NMOR (99,99% de pureza) foram preparadas soluções estoques a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  em metanol. As soluções de trabalho foram obtidas por diluições destas em um intervalo de 0,1 a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

**PRIMEIRA PARTE: Determinação do máximo de absorção**

Com a solução de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de cada nitrosamina isolada foi feita uma varredura no intervalo de 200 a 400 nm. Os espectros gerados de (Absorbância x Comprimento de Onda) permitiram a determinação dos máximos de absorção conforme pode ser visto na Figura III-1. A Tabela III-1 apresenta os  $\lambda_{\text{max}}$  para cada um dos compostos.

**Tabela III-1:** Valores de  $\lambda_{\text{max}}$  para os compostos estudados

Composto	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Peso molecular	Composto	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Peso molecular
DMN	229	74	NPIP	236	114
DEN	231	102	NMOR	244	116
NPIR	231	100	DBN	234	158

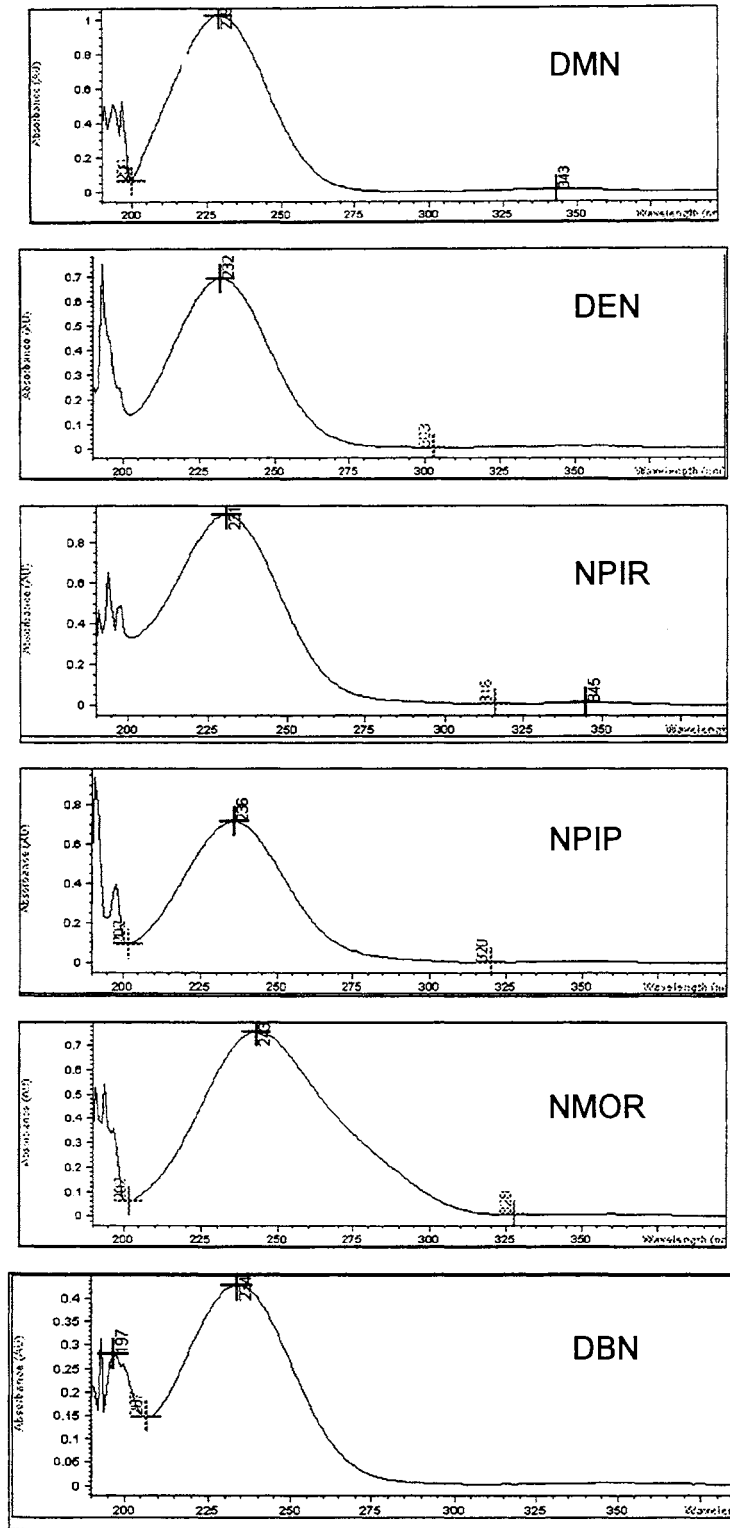


Figura III-1: Espectros de UV-vis para cada Nitrosamina estudada (soluções individuais a 10 mg L<sup>-1</sup> em metanol)

## SEGUNDA PARTE: Construção das curvas de calibração

As curvas foram construídas selecionando o comprimento de onda referente ao  $\lambda_{\max}$  de cada padrão e fazendo variar as concentrações dos compostos padrões, de acordo com a Tabela III-2. A Figura III-2 apresenta as curvas de calibração obtidas para cada compostos analisado.

**Tabela III-2:** Concentrações das soluções dos padrões de nitrosaminas usadas na construção das curvas de calibração

comp.	concentração (mg L <sup>-1</sup> )	comp.	concentração (mg L <sup>-1</sup> )
DMN	0,1, 0,4, 1,0, 3,0 5,0 10,0	NPIP	0,2, 0,4, 1,0, 3,0, 5,0 10,0
DEN	0,2, 0,4, 1,0, 3,0 5,0 10,0	NMOR	0,2, 0,4, 1,0, 3,0, 5,0 10,0
NPIR	0,1, 0,4, 1,0, 3,0 5,0 10,0	DBN	0,2, 0,4, 1,0, 3,0, 5,0 10,0

## TERCEIRA PARTE: Estudo da mistura de padrões

Uma vez completado o estudo de cada padrão isoladamente, foi construída a curva de calibração para a mistura dos padrões em diferentes concentrações. O procedimento utilizado foi o que segue:

- Varredura da mistura total na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, de 200 a 400 nm;
- Construção da curva de calibração nas concentrações de 0,02; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 3,00 e 5,00 mg L<sup>-1</sup>.
- Cálculo dos Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

A Figura III-3 apresenta o espectro de absorção de absorção no UV-vis para a mistura e a Figura III-4 apresenta a curva de calibração construída. Na Tabela III-3 tem-se os limites de detecção e quantificação para cada nitrosamina estudada.



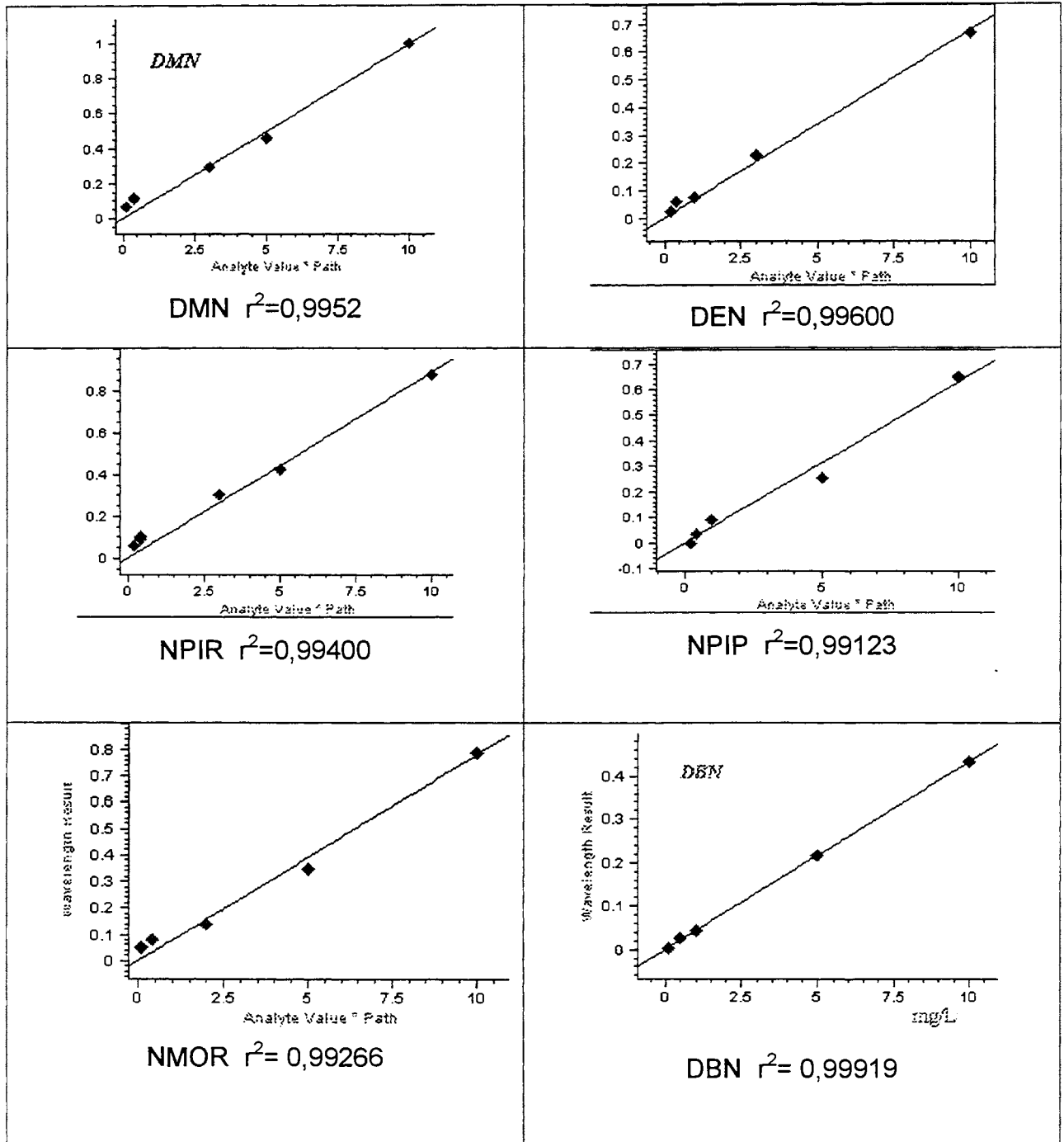
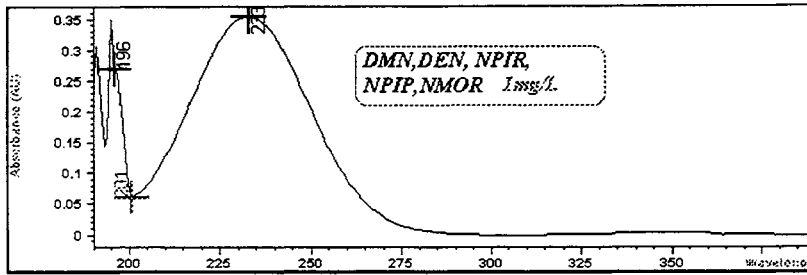


Figura III-2: Curvas de Calibração obtidas para cada composto analisado por UV-vis



$\lambda_{max} = 233 \text{ nm}$

Figura III-3: Espectro de UV-vis para a mistura a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$

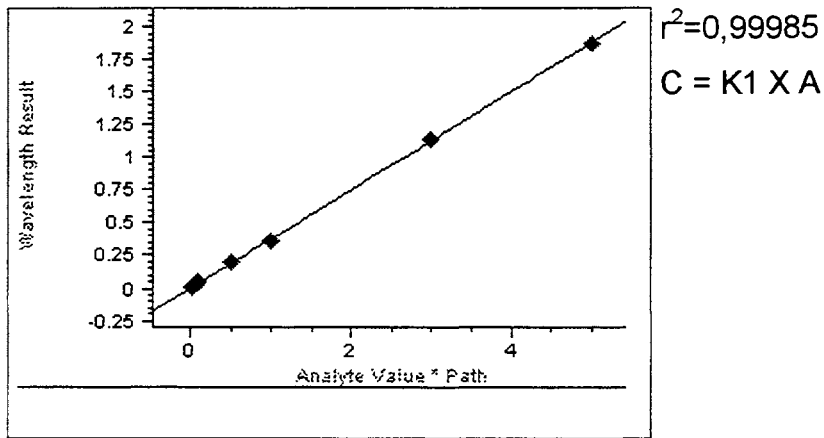


Figura III-4: Curva de Calibração para a análise das Nitrosaminas por UV-vis

Tabela III-3: Limites de Detecção e de Quantificação para a análise das Nitrosaminas por UV-vis

Analito	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Analito	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
DMN	401	1336	NMOR	483	1611
NPIR	366	1222	NPIP	437	1457
DEN	174	581	DBN	51	170
mistura	37	123			

## 8.4. ANEXO IV: PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA NO PERÍODO

### 8.4.1. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO

- 8.4.1.1.** P.J Sanches Filho, E.B. Caramão e K. Zanin, "Pré-concentração de nitrosamina por extração em fase sólida com carvão ativo". Trabalho apresentado no 10<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica, UFSM, Santa Maria, RS, 1999. Pôster e apresentação oral em sessão coordenada. Publicado no Livros de Resumos.
- 8.4.1.2.** P.J Sanches Filho, E.B. Caramão e K. Zanin, "Estudo de Pré-concentração de nitrosaminas a partir de matrizes Aquosas usando carvão ativo como fase sólida". Trabalho apresentado no VII Encontro de Química da Região Sul-SBQ, Tubarão, SC, Outubro de 1999. Publicado nos Livros de Resumos
- 8.4.1.3.** P.J Sanches Filho, E.B. Caramão e K. Zanin, "Estudo comparativo para pré-concentração de nitrosaminas por EFS (carvão ativo, XAD-4) e ELL". Trabalho apresentado no Salão de Iniciação Científica da UFRGS Porto Alegre, RS, 1999. Publicado no Livro de Resumo.
- 8.4.1.4.** P.J Sanches Filho, E.B. Caramão e K. Zanin spe with charcoal in research of nitrosamines in sausages". Trabalho apresentado no VIII COLACRO, Buenos Aires, Argentina, Abril de 2000. Publicado no livro de resumos sob número V53. Recebendo prêmio de melhor trabalho.
- 8.4.1.5.** P.J Sanches Filho, E.B. Caramão e K. Zanin, "Extração de nitrosaminas em salsichas em conserva, usando SPE com carvão ativo". Trabalho apresentado no VII Encontro de Química da Região Sul, Santa Cruz, outubro de 2000. Publicado no livro de resumos.
- 8.4.1.6.** P.J Sanches Filho, A. Rios, M. Valcárcel E.B. Caramão "Development of a methodology to the determination of nitrosamines by capillary eletrophoresis". Trabalho apresentado no 24<sup>th</sup> International Symposium on Capillary

Chromatography and Electrophoresis”, Las Vegas, Nevada USA, Maio de 2001. Publicado no livro de resumos.

- 8.4.1.7.** P.J Sanches Filho, A. Rios, M. Valcárcel E.B. Caramão e K. Zanin, “Determinação de nitrosaminas em salsichas por MEKC e SPE com carvão ativo”. Trabalho apresentado no 11<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica UNICAMP, Campinas-SP, setembro de 2001. Publicado no livro de resumos sob número SE 51.
- 8.4.1.8.** P.J Sanches Filho, A. Rios, M. Valcárcel E.B. Caramão “Estudo do carvão ativo granular para pré-concentração de nitrosaminas a partir de matrizes aquosas para análise por eletroforese capilar”. Trabalho apresentado no XLI congresso Brasileiro de Química, Porto Alegre, RS, setembro 2001, poster e comunicação oral. Gravado no CD de resumos.
- 8.4.1.9.** P.J Sanches Filho, E.B. Caramão e K. Zanin, “Extração e identificação de nitrosaminas em salsichas em conserva”. Trabalho apresentado IX Encontro de Química da Região Sul-SBQ Sul, Londrina, PR, Novembro 2001. Publicado no livro de resumos.
- 8.4.1.10.** P.J Sanches Filho, E.B. Caramão e K. Zanin, “Uso da SPE em leito fixo com carvão ativo para análise de nitrosaminas”. Trabalho apresentado no Salão de iniciação Científica UFRGS, Porto Alegre, RS, março 2002. Gravado CD de resumos
- 8.4.1.11.** P.J Sanches Filho, E.B. Caramão e K. Zanin, P. Schossler R. Schneider, A. Rios, M. Valcárcel, “Otimização de metodologia para extração de nitrosaminas voláteis por sfe em equipamentos comerciais.” Trabalho apresentado na 25<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas, MG, maio de 2002. Publicado no livro de Resumos.
- 8.4.1.12.** P.J Sanches Filho, K. Zanin A. Rios, M. Valcárcel E.B. Caramão, “Comparative study to determination of the nitrosamines in canned sausages by MEKC and GC/MSD”. Trabalho apresentado no 25<sup>th</sup> International Symposium on

Capillary Chromatography and Electrophoresis, Riva, Itália 2002. Gravado CD de resumos.

- 8.4.1.13. P.J Sanches Filho, A. Rios, M. Valcárcel E.B. Caramão “Estudo comparativo entre Resina XAD4, carvão ativo (granular e em pó) para aplicação em extração em fase sólida de nitrosaminas a partir de amostras aquosas” Trabalho apresentado no XLII Congresso Brasileiro de Química Rio de Janeiro, RJ, setembro 2002. Poster e Comunicação Oral. Publicado no Livro de Resumos.

#### 8.4.2 TRABALHOS ACEITOS E PUBLICADOS EM REVISTAS

- 8.4.2.1. P.J Sanches Filho, E.B. Caramão e K. Zanin “Estudo da Resina XAD-4 para pré concentração de nitrosaminas por adsorção em fase sólida”. *Tema*, Ano 3 (nº 1), CEFET-RS, pg. 15-20, abril 2000.
- 8.4.2.2. P. J.Sanches Filho, V. R. P. Nogueira, L. C. Krause, M. R. A. Rodrigues, M. C. R. Peralba, “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Candiota (south brazilian) Coal Extracts”, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 22, 13-22, 2002
- 8.4.2.3. P.J Sanches Filho, R. C. Garcia, K. Zanin A. Rios, M. Valcárcel E.B. Caramão, “Pré-concentração de Nitrosaminas a partir de amostras aquosas por extração em fase sólida e cromatografia capilar eletrocínética micelar”, *Química Nova*, *in press*.
- 8.4.2.4. P.J Sanches Filho, K. Zanin A. Rios, M. Valcárcel E.B. Caramão, “Determination of nitrosamines in preserved sausages by MEKC”, *Journal of chromatography*, *in press*.

### 8.4.3 ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

- 8.4.3.1. P.J Sanches Filho, K. D. Zanin, A. Rios, M. Valcárcel, E.B. Caramão, "Development of a new method for the determination of nitrosamines by micellar electrokinetic capillary chromatography", *Water Research*, *submitted*.

## **8.5. ANEXO V: CÓPIA DOS ARTIGOS PUBLICADOS**

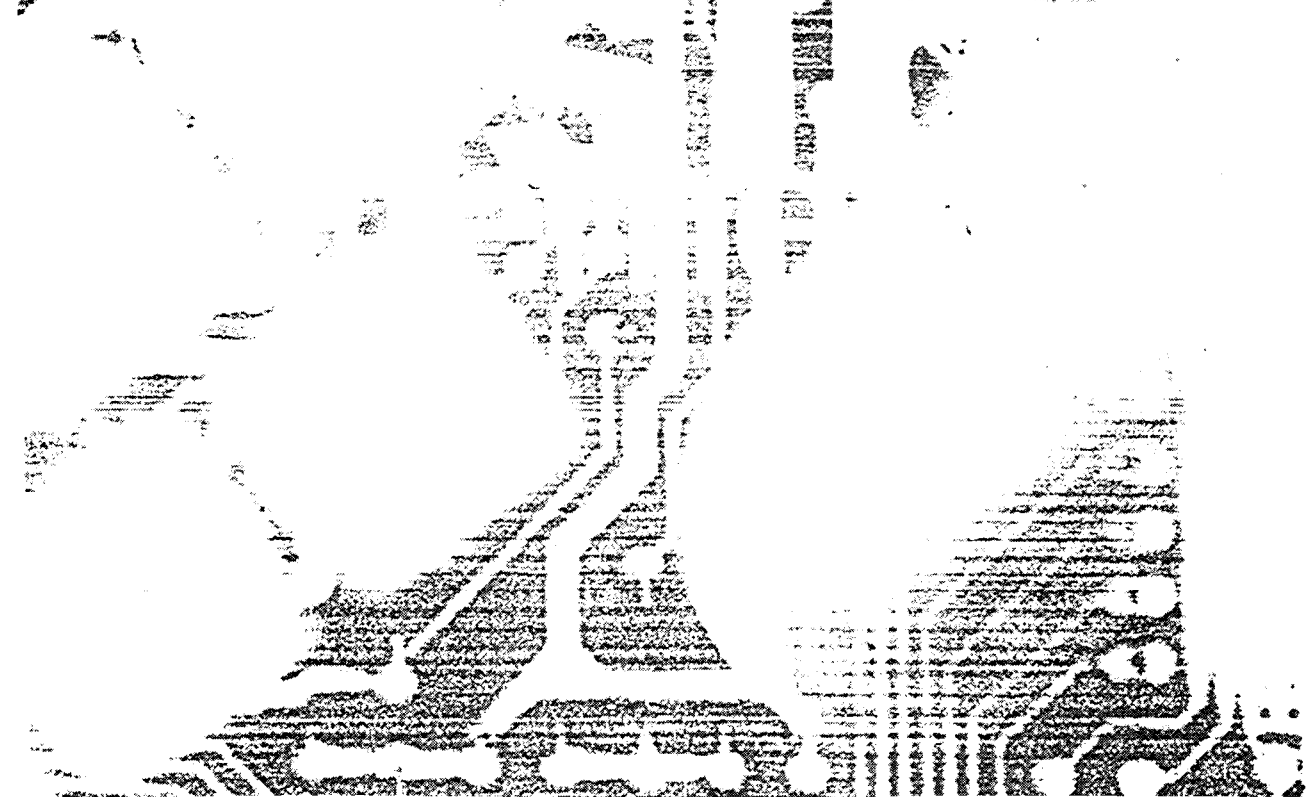
8.07

ISSN 1517-6312

# Thema

Revista Científica do Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas  
Ano 3 - Nº 1 - Abril/2000

# 2000 Anos Tecnologia onlinamente





**Thema:** Revista Científica do Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas-RS  
Ano 3 - Número 1 - Abril 2000

A revista **Thema** é um órgão de divulgação do Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas (CEFET-RS) sem fins lucrativos, fundada em junho de 1997. É editada pela Assessoria de Comunicação Social, vinculada ao Gabinete da Direção Geral do CEFET-RS.

Tem por finalidade divulgar artigos de caráter tecnológico e/ou científico, visando estimular o processo de aprendizagem, incentivando a construção do conhecimento.

**Nota:** Todos os artigos assinados, bem como sua redação, são de exclusiva responsabilidade de seus autores, não refletindo, necessariamente, a opinião desta revista.

Permitida a reprodução total ou parcial, desde que citada a fonte.

#### Diretor Geral do CEFET-RS

*Prof. Edelbert Krüger*

#### Conselho Editorial

*Mariza Helena Soares da Rocha*

*Ana Maria Cardoso Lucena*

*Édgar Antônio Costa Mattarredona,*

*Laís Amélia Ribeiro de Siqueira*

*José Carlos Pereira Nogueira*

*Ricardo Pereira Costa*

*Rodrigo Nogueira Olendzki*

#### Periodicidade

*Semestral*

#### Tiragem

*1.000 exemplares*

#### Composição Gráfica

*Coordenação de Administração de Produção Gráfica do CEFET-RS*

#### Apoio

*FUNCEFET*

#### Projeto Gráfico

*Alex Maldonado*

#### Colaboradores

*Álvaro Clemente Carabajal de Almeida*

*Cláudio Anderson da Costa Freitas*

#### Revisão

*Lúcia Gadret Rizzolo*

*Laís Amélia Ribeiro de Siqueira*

---

### Nossa Capa:

Alex Maldonado, enquanto aluno do 4º ano do Curso Técnico de Desenho Industrial deste CEFET, criou o projeto gráfico desta revista baseado na reviravolta tecnológica que o nosso mundo de hoje enfrenta.

---



ISSN 1517-6312

Thema - Revista Científica do CEFET-RS

ano 3, nº 1, p. 01-46, abril-2000.

Endereço para correspondência:

Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas-RS

Assessoria de Comunicação Social (ACS)

CEP 96015-360 - Pelotas-RS

Telefone: (53) 284-5004

E-mail: [thema@etfoel.tche.br](mailto:thema@etfoel.tche.br)

# Estudo de Nitrosaminas a partir de Matrizes Aquosas Utilizando Extração em Fase Sólida com Resina XAD-4

*Pedro José Sanches Filho*

*Professor de Química, CEFET-RS, e doutorando em Química, CPGQ-UFRGS,*

*Kelen Daiane Zanin*

*Aluna de Iniciação Científica do IQ-UFRGS*

*Elina Bastos Caramão*

*Orientadora de Doutorado, IQ-UFRGS*

## Resumo

Este trabalho tem por objetivo o emprego da extração em fase sólida (EFS) com resina Amberlite XAD-4<sup>TM</sup> para extração e posterior análise de nitrosaminas, em nível de mg/L, a partir de matrizes aquosas ambientais. O método utilizado é composto pelas etapas de extração e pré-concentração, aliados a técnicas de separação e detecção seletiva, usando CG/MS (cromatografia gasosa capilar acoplada à espectrometria de massas). Para o desenvolvimento deste trabalho, foram usadas soluções-padrão aquosas de nitrosaminas nas concentrações de 400, 800 e 1200 mg/L, as quais foram submetidas à extração em fase sólida com a resina Amberlite XAD-4<sup>TM</sup>. O processo foi acompanhado por cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Foram estabelecidas as condições cromatográficas, a faixa de linearidade de resposta e o limite de detecção. Nesta faixa de concentração foi evidenciada a saturação da fase XAD-4<sup>TM</sup>. O método mostrou-se adequado para extração e pré-concentração, principalmente das nitrosaminas de menor polaridade, não sendo adequado para análise dos compostos de menor peso molecular (mais polares) como Dimetilnitrosamina (DMN), Metiletilnitrosamina (MEN) e Dietilnitrosamina (DEN).

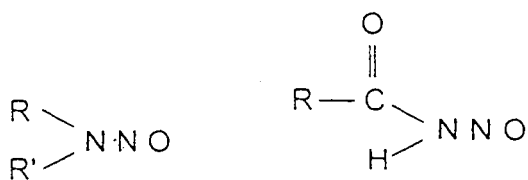
## Introdução

O limite de detecção de contaminantes traços em amostras ambientais está continuamente sendo deslocado para níveis mais baixos, pelo aumento da sofisticação do instrumental analítico. Análises estão agora sendo desenvolvidas rotineiramente em níveis antes não atingidos, para uma grande variedade de compostos, incluindo desde metais pesados, resíduos de pesticidas, HPAc, Bifenilas policloradas

(PCBs) até uma classe de compostos N-nitrosos mais comumente conhecidos como nitrosaminas<sup>1</sup>.

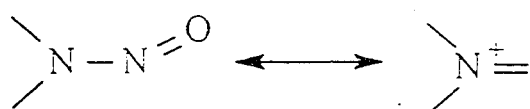
### *Nitrosaminas: Aspectos Gerais*

O termo *nitrosamina* reúne uma grande variedade de pesos moleculares e tipos estruturais de compostos N-nitrosos que contém o grupo funcional característico N-NO, entre estes, incluem-se as nitrosaminas e nitrosamidas<sup>2</sup>.

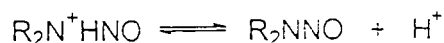
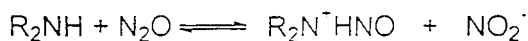
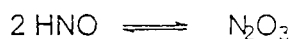


R e R' = radical alquil ou aril

As nitrosaminas são sólidos voláteis, ou óleos, de coloração amarela devido à absorção da luz visível pelo grupo **NNO**, com um elétron deslocalizado no grupo funcional, conferindo suficiente caráter de dupla ligação para a ligação N-N, tanto que isômeros E e Z, os quais resultam da substituição assimétrica, freqüentemente podem ser separados<sup>2</sup>.



Surgem como produtos da reação de aminas ou aminoderivados com agentes nitrosantes. Formam-se em meio ácido (pH 3) tanto no meio ambiente quanto "in vivo", conforme o mecanismo apresentado abaixo<sup>1,2</sup>. Embora ocorra em meio ácido, a espécie química que sofre a reação é a pequena de amina livre presente, não sobre a forma de sal<sup>1,2</sup>.



As nitrosaminas uma vez formadas são relativamente estáveis e difíceis de serem destruídas<sup>1,2</sup>. O estudo desta classe de compostos justifica-se pela grande distribuição dos mesmos no ambiente e em diversos materiais. Nitrosaminas são tóxicas e podem levar à cirrose, à hemorragia gastrointestinal, a necrose hemorrágica do fígado, ou a hemorragias na cavidade peritoneal. Associado a isto, grande parte dos compostos que formam este grupo apresentam elevada carcinogenicidade e

mutagenicidade<sup>3,4</sup>. O limite tolerável para o homem está na faixa de 10 ppb<sup>5,6</sup>.

Nitrosaminas têm sido isoladas e identificadas em uma série de materiais, incluindo gêneros alimentícios<sup>1</sup> (queijos<sup>7</sup>, bacon<sup>8</sup>, salames e salsichas<sup>9</sup>, cervejas<sup>10,11</sup>), produtos farmacêuticos<sup>1</sup>, tabaco<sup>12,14</sup>, amostras ambientais<sup>1</sup> (água<sup>15,16</sup>, solo<sup>1</sup>, ar<sup>17</sup> etc.), pesticidas, herbicidas, borracha, cosméticos<sup>1</sup> etc.

As nitrosaminas são normalmente analisadas por cromatografia gasosa com detectores específicos. O detector seletivo para Nitrosaminas é o *Thermal Energy Analyser* (TEA), o qual, além de ter alto custo de instalação e manutenção e ser bastante complexo, possui uso restrito e é suscetível a muitas interferências<sup>18</sup>. Para superar estas limitações, neste trabalho propõe-se a utilização do espectrômetro de massas para identificação dos compostos, juntamente com a combinação dos tempos de retenção cromatográfica<sup>19,20</sup>.

### Extração em fase sólida

Normalmente, a maioria das amostras necessita de algum tipo de preparação antes da análise. É raro quando uma amostra coletada a partir do ambiente pode ser injetada diretamente no cromatógrafo, sem tratamento prévio. A preparação pode ser necessária para remover ou reduzir os componentes da amostra que possam interferir na identificação dos analitos de interesse. Ainda, se a amostra for adequada para análise direta, freqüentemente os analitos se encontram em concentrações muito baixas para a detecção<sup>21</sup>.

Os métodos de preparação têm resultado em uma substancial redução do volume da amostra e, conseqüentemente, em um aumento na concentração do analito que o limite de detecção do equipamento escolhido seja atingido<sup>21,22</sup>.

Os métodos de preparação podem ser adaptados ao tipo de amostra. Cromatografia líquida e extração líquido-

líquido estão dentre os métodos mais antigos e mais freqüentemente usados.

Uma técnica bastante atual é a chamada *extração em fase sólida* (EFS). Esta técnica é adequada para muitas amostras ambientais, requer aparelhagem simples, proporciona um "clean up" superior à extração Líquido-líquido, e reduz substancialmente o consumo de solvente, reduz ainda o tempo requerido para a preparação das amostras para análise. O custo do material por amostra é igual ou, em muitos casos, mais baixo que a correspondente extração Líquido-líquido. Por todos estes aspectos a extração em fase sólida apresenta-se como um método superior à extração líquido-líquido<sup>22-24</sup>.

Neste trabalho usou-se a EFS, tendo como fase sólida a resina XAD-4<sup>TM</sup>, que é um copolímero resultante da reticulação tridimensional do estireno e dá origem a um material macroporoso não iônico que possui grande área superficial<sup>24,25</sup>, o que resulta em uma grande capacidade absorptiva.

## Parte Experimental

**Amostra:** Foram usadas soluções aquosas de padrões de nitrosaminas (400, 800 e 1200 ppb), preparadas a partir de uma solução estoque aquosa a 200 ppm. Os padrões foram escolhidos a partir da listagem dos poluentes orgânicos prioritários da EPA (Agência de Proteção Ambiental Americana). Os padrões estudados foram: Dimetilnitrosamina (DMN), Dietilnitrosamina (DEN), Etilmetilnitrosamina, Dipropilnitrosamina (DPN), Dibutilnitrosamina (DBN), Nitrosipirrolidina (NPIR), Nitrosopiperidina (NPIP) e, como padrão interno, usou-se uma solução a 20 ppm de bifenila. utilizada a técnica descrita na referência 24. A resina macro-reticular é pré-purificada em extrator Soxhlet com ace-

### Processo de extração em fase sólida:

Para avaliação da resina XAD-4<sup>TM</sup> foi

tona (5 horas), metanol (5 horas) e Diclorometano por mais 5 horas. Posteriormente é seca em forno à temperatura de 300 °C.

Uma grama da resina foi acondicionada com água bidestilada e disposta em uma coluna de vidro (25 cm x 1,1 cm). Vinte e cinco miligramas da amostra foram percolados através da coluna, ficando retidas as nitrosaminas. Para a eluição destes compostos, fez-se passar 10 ml de Diclorometano (DCM) bidestilado, a um fluxo de 5 ml/min, que foi recolhido e seco em 6g de Sulfato de Sódio anidro, e teve o seu volume reduzido a 1 ml sob Nitrogênio gasoso e cromatografado.

Para controle da limpeza da resina fez-se um branco com DCM, cromatografando-se o eluído. A ausência de picos no cromatograma obtido indica que a resina está pronta para o uso. O esquema do processo encontra-se na Figura 1.

Os eluatos foram concentrados sob fluxo de nitrogênio em banho de gelo, separadamente, sendo seus volumes corrigidos a 1 ml.

A água residual foi submetida ao processo de extração Líquido-líquido, sendo os extratos reunidos e concentrados sob fluxo de Nitrogênio em banho de gelo, recebendo o mesmo tratamento dos eluatos. Todas as frações foram cromatografadas no GC/FID (cromatografia gasosa com detector de ionização de chama) e GC/MS (cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas).

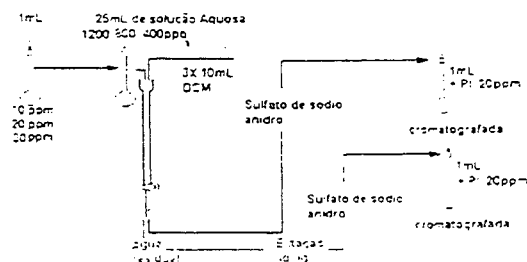


Figura 1: Esquema geral do procedimento analítico adotado.

Para otimização das condições no GC/FID e GC/MS utilizou-se uma solução a 20 ppm da mistura padrão com 20 ppm de bifênila como padrão interno.

Injetaram-se padrões de 250 ppb a 30 ppm no GC/MS e de 5 ppm a 30 ppm no GC/FID. As melhores condições estão apresentadas junto aos cromatogramas

### Equipamentos

**GC/MS:** Shimadzu QP 5050, operando em modo SCAN e SIM, com injeções split e splitless, colunas HP-5 (20 m x 0,25 mm) e DBWAX-20M (25 m x 0,25 mm).

**GC/FID:** HP-5890 - série II, operando com injeção split e coluna capilar HP-5 (25 m x 0,25 mm).

### Discussão e resultados

As Figuras 2 e 3 apresentam os cromatogramas (GC/FID e GC/MS, respectivamente) da mistura padrão a 20 ppm. A identificação dos picos assinalados está apresentada na Tabela 1.

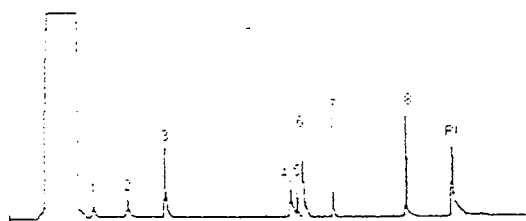


Figura 2: GC/FID da Solução Padrão a 20 ppm, com PI a 20 ppm

Coluna HP-5, 40°C (2min); 5°C/min até 75°C (5min); 15°C/min até 225°C (5min), injeção de 3,0 mL no modo Splitless, gás de arraste Hidrogênio com pressão de 10 PSI na cabeça da coluna

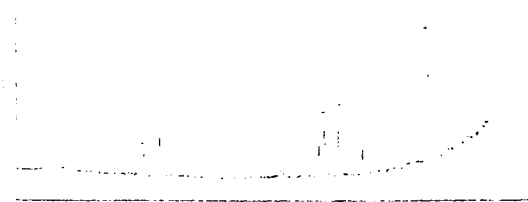


Figura 3: GC/MS da Solução Padrão a 20 ppm, com PI a 20 ppm

Coluna DBWAX20M, 35°C (3min); 5°C/min até 75°C (0min); 15°C/min até 200°C (8min), injeção de 1,5 mL no modo Split (1:20), gás de arraste Hélio com fluxo de 1 ml/min

pico	sigla	nome	pico	sigla	nome
1	DBN	N-Dimetilnitrosamina	5	NMO	N-Nitrosomorfolina
2	PEM	N-Etiletilnitrosamina	6	DPN	N-Dipropilnitrosamina
3	DEM	N-Dietilnitrosamina	7	NPIP	N-Nitrosopiperidina
4	NPIR	N-Nitrosopiperidina	8	DBN	N-Dibutilnitrosamina

Tabela 1: Identificação dos picos da Figura 2 e 3

Observa-se melhor resolução e maior sensibilidade na Figura 3 (GC/MS). A melhor resolução fica por conta da coluna, ou seja, a coluna DBWAX-20M é mais adequada para este tipo de compostos, uma vez que apresenta maior polaridade. Esta coluna é constituída de polietilenoglicol de peso molecular 20 M, enquanto que a coluna BD-5 é composta de polimetilsiloxano com 5% de grupamentos fenila. Para a coluna BD-5 observa-se uma separação de acordo com o peso molecular, com certa dificuldade de separação entre os compostos 4 e 5 (NPIR e NMO). A separação completa destes compostos poderia ser melhorada com uma coluna do mesmo tipo, porém mais longa.

Na coluna DBWAX-20 M foram obtidos melhores resultados, observando-se a inversão na ordem de saída dos compostos, aumentando o tempo de retenção para os compostos mais polares como a NPIR (4) e NMO (5) e uma diminuição dos tempos de retenção dos compostos de menor polaridade. A DBN (8) que era o último composto a sair passa a ser o 5º pico.

A Figura 4 (a, b, c) apresenta os cromatogramas dos eluatos com DCM a partir de soluções de concentração conhecida. Estes cromatogramas comprovam a retenção das nitrosaminas na resina XAD-4<sup>TM</sup>. Para as soluções de 400 ppb e 800 ppb, 10 ml de DCM foram suficientes para a dessorção dos compos-

tos, já na solução a 1200 ppb detectou-se a presença dos compostos no segundo eluato (V'), obtido com a adição de mais 10 ml de DCM, isto fez com que o trabalho fosse desenvolvido com eluição dos compostos usando 20 mL de DCM e mais um VOLUME ADICIONAL (V'') de 10 ml de DCM para garantir a recuperação total dos compostos adsorvidos.

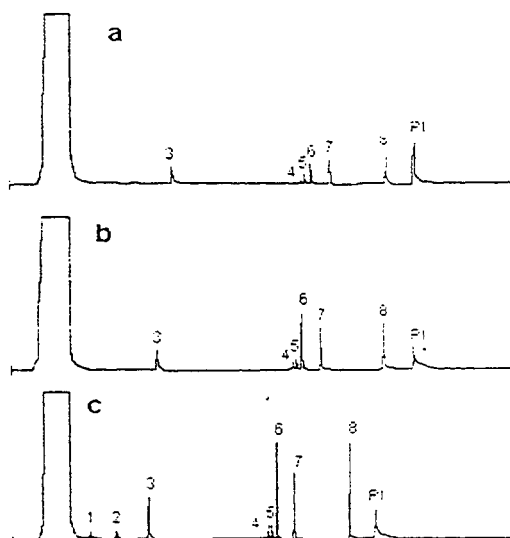


Figura 4: GC/FID do Eluato com DCM. (a) 400 ppb, (b) 800 ppb, (c) 1200 ppb.

Coluna HP-5, 40°C (2min); 5°C/min até 75°C (5min); 15°C/min até 225°C (5min), injeção de 3,0 ml no modo Splitless, gás de arraste Hidrogênio com pressão de 10 PSI na cabeça da coluna.

Os cromatogramas dos extratos líquido-líquido com DCM indicaram a presença de nitrosaminas não retidas pela XAD-4™ como os compostos 1 e 2, sugerindo uma possível saturação da fase para os demais compostos. Na Figura 4 observamos a presença de nitrosaminas na água residual da amostra sintética a 400 ppb.

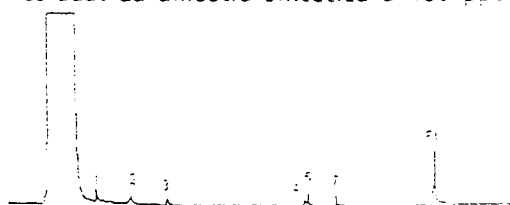


Figura 5 Cromatograma do Extrato Líquido-Líquido da Solução Aquosa Residual, a partir da solução a 400 ppb

Coluna HP-5, 40°C (2min); 5°C/min até 75°C (5min); 15°C/min até 225°C (5min), injeção de 3,0 ml no modo Splitless, gás de arraste Hidrogênio com pressão de 10 PSI na cabeça da coluna

Para os estudos de recuperação comparamos as razões de área entre o composto de interesse e o Padrão Interno, obtidos nos cromatogramas dos eluatos, com as razões de área de soluções padrão que não sofreram o processo. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 6 e na Tabela 2.

Compostos	% de Recuperação		
	400 ppb	800 ppb	1200 ppb
DMN	--	--	20,02
MEN	--	--	55,15
DEN	70,40	45,60	48,00
NPIR	35,00	31,80	72,50
NMO	36,00	36,60	79,14
DPN	91,00	85,50	40,97
NPIP	81,50	75,90	49,04
DBN	63,50	88,40	49,59

Tabela 2: Variação do percentual de recuperação dos compostos com a concentração da Solução Padrão Usada (para testes em triplicata) % de Recuperação

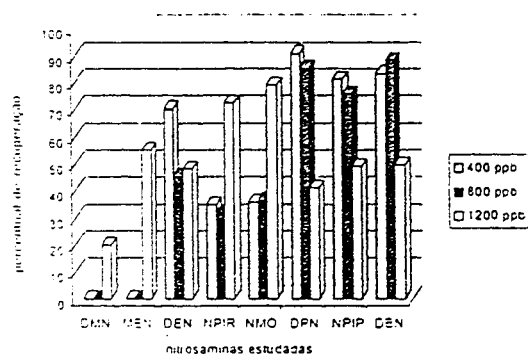


Figura 6: Representação da Variação do percentual de recuperação das nitrosaminas em função da concentração da Solução Padrão

Como pode-se observar, para esta faixa de concentração, ocorreu a saturação da resina. Fica clara a maior afinidade da resina com os compostos de menor polaridade como a DPN, DBN e NPIP. Os compostos 6 (DPN) e 8 (NPIP) não foram en-

contrados nas águas residuais de 400, como podemos observar na Figura 5, indicando a retenção total dos mesmos na fase estacionária. Já os compostos mais polares, praticamente não foram retidos pela coluna.

## Conclusões

O método é adequado para análise de nitrosaminas, especialmente em relação aos compostos de menor polaridade, com recuperações obtidas a partir das soluções de 800 e 400 ppb em torno de 80%.

A queda na taxa de recuperação com o aumento da concentração está relacionada com a possível saturação da fase sólida. Sendo a quantidade adsorvida constante e o máximo permitido para a quantidade de fase usada, o excedente de solução não é retido na coluna.

A baixa recuperação dos compostos polares pode ser explicada pela constante de distribuição favorável em relação a matriz aquosa, sendo também, em parte, devida às perdas por volatilidade nas etapas de concentração.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPERGS (bolsa de Iniciação Científica), ao curso de Química do CEFET-RS, ao Instituto de Química da UFRGS, pela participação no desenvolvimento deste trabalho.

## Bibliografia

- 1 K. Ikeda, K.G. Migliorese, *J. Soc.Chem.*, 41,283-333,1990.
- 2 KIRK-Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, 15, 988, 3ª ed, Ed John Wiley & Sons, New York, 1981.
- 3 IARC, *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans- Some N-nitroso Compounds*, 17, Lyon, May, 1978.
- 4 G.S. Drescher, C.W. Frank, *Anal. Chem.*, 50(14), 2118, 1978.
- 5 E. Liener, *Food Science and Technology*, Ed academic Press, New York, 1974.
- 6 D. H. Fine, *J. Agric. Food Chem.*, 24(5),1069, 1976.
- 7 M. B. A. Glória, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3577, 1997.
- 8 M. B. A. Glória, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1816, 1997.
- 9 G. M.Telling, *J. Agric. Food Chem.*, 19(5), 937, 1971.
- 10 M. B. A. Glória, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 814, 1997.
- 11 N. P. Sem, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1498, 1996.
- 12 K. D. Brunnemann, J. C. Scott, D. Hoffmann, *J. Agric. Food Chem.*, 31, 905, 1983.
- 13 M. V. Djordjvic, *J. Agric. Food Chem.*, 41,1790, 1993.
- 14 ARRENDAL, *Anal. Chem.*, 58, 565, 1986.
- 15 C. Fu, H. Xu, *Analyst*, 120, 1147, 1995.
- 16 B. A. Tomkins, *Anal Chem.*, 67(23), 4387, 1995.
- 17 D. P. Rounbehler, *Anal Chem.*, 52(2), 273, 1980.
- 18 D. H.Fine, *Anal Chem.*, 47(7), 1188, 1975.
- 19 T. A.Gough, *J. Agric. Food Chem.*, 25, 664, 1977.
- 20 R.W. Stephane, *J. Agric. Food Chem.*, 24(3), 536, 1976.
- 21 J. Namiesnik, *Analytica Chimica Acta*, 237, 1, 1990.
- 22 S. Guenu, M.C. Hennion, *J. Chromatog. A*, 725, 57, 1996.
- 23 J. A. Khavkine, M. J. Khavkine, *Analytical Letters*, 31(2), 355, 1998.
- 24 T. M. Pizzolato, *Tese de Doutorado*, PPGEM, UFRGS, 1997.
- 25 G.R. Airem, *Anal Chem*, 51(11), 1799, 1979.

Hydrocarbons in Some Urban Areas  
*Z. Salliene, D. Brukstiene, and A. Ruzgyte*

23

A Study of the Interaction of Polycyclic Derivatives of  
Azaquinolizinium Salts with DNA  
*M. A. Martín, A. S. Bouin, S. Muñoz-Botella,  
and B. del Castillo*

37

Surfactant Micellar Solutions as Alternative Solvents for  
Microwave-Assisted Extraction of Polycyclic Aromatic  
Hydrocarbons from a Spiked River Sediment  
*Monica Gulmini, Alessandra Bianco Provot, Edmondo  
Pramauro, and Vincenzo Zelano*

55

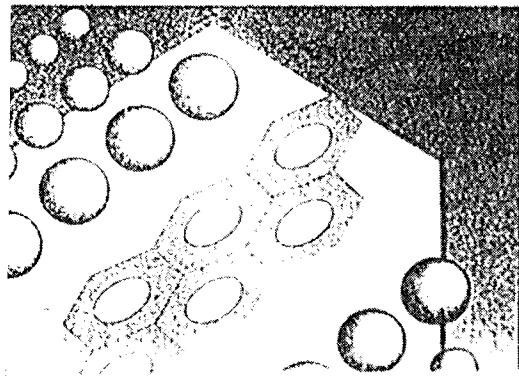
Synthesis of Fluorinated Polycyclic Aromatic  
Hydrocarbons Through a Photochemical Cyclization  
*Uwe Weis and Jan T. Anderson*

71

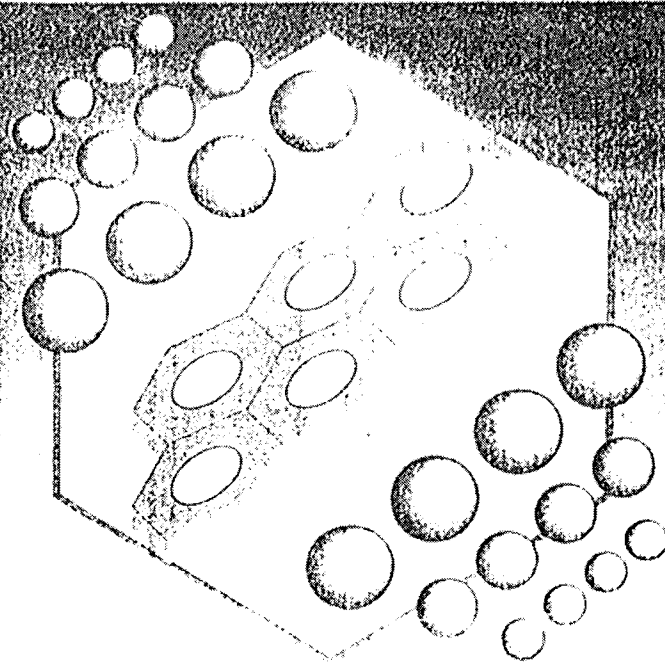
Metabolization of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon  
Benzo(a)pyrene by a Non-White Rot Fungus  
(*Fusarium Solani*) in a Batch Reactor  
*E. Volgnio, C. Rafin, A. Lounos-Hadj Sahraoui, P. Woisot,  
and F. Cazier*

87

POLYCYCLIC  
AROMATIC  
COMPOUNDS



# POLYCYCLIC AROMATIC COMPOUNDS



The Journal of  
the International  
Society for  
Polycyclic  
Aromatic  
Compounds

EDITOR IN CHIEF

P. Garrigues

EDITORS

J. Fetzer

W. C. Hemdon

J. Jacob

D. A. Lane

S. R. Myers

V. Snieckus

T. Vo-Dinh

E. H. Weyand

C. M. White

S. A. Wise

Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in  
Barn Owls (*Tyto Alba*) from Northwest Spain by SFE  
and HPLC-FL Analysis  
*S. González Amigo, J. Simal Lozano,  
and M. A. Lage Yusty*

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Candiota  
(South Brazilian) Coal Extracts  
*Pedro José Sanches Filho, Vera Regina Pereira  
Nogueira, Laiza Canelas Krause, Maria Regina*





## POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS FROM CANDIOTA (SOUTH BRAZILIAN) COAL EXTRACTS

*Pedro José Sanches Filho*

*Escola Técnica Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil*

*Vera Regina Pereira Nogueira*

*Lafza Canielas Krause*

*Maria Regina Alves Rodrigues*

*Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil*

*Maria do Carmo Ruaro Peralba*

*Elina Bastos Caramão*

*Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,  
RS, Brazil*

*The bitumen composition of Candiota coal (south Brazil) was investigated. Coal bitumen was produced by Soxhlet extraction using toluene. Two chromatographic techniques were tested for bitumen fractionation: adsorption liquid chromatography on silica (ALCS) and adsorption liquid chromatography on alumina (ALCA). Results were compared in terms of the quality and quantity of hydrocarbons isolated. Several linear saturated hydrocarbons were found in the range of 14 to 33 carbons. Pyrene, chrysene, and other polycyclic hydrocarbons with recognized mutagenic and carcinogenic properties were found in the aromatic fractions. Chromatographic methodology using alumina shows better results in the fractionation of bitumen.*

**Keywords** coal, polycyclic aromatic hydrocarbons, Soxhlet extraction

Received 12 January 2001; accepted 12 February 2001.

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) for financial support.

There is a lot of work to be done in south Brazilian coal, whose chemical structure is still not well defined (1). The coal reserves in Brazil represent 60% of Brazil's nonrenewable energy sources. Candiota Mine is located in Rio Grande do Sul, south Brazil. It has been in operation since 1960, producing coal to supply the thermoelectric complex of Candiota. The total reserve of Candiota is estimated as 12.3 billion tons, representing 37.9% of the Brazilian coal reserves and 43.9% of the of Rio Grande do Sul reserves (2). According to the international classification (2), Candiota coal can be classified as semibituminous coal, mainly by its high content of ashes (mineral material).

The strategic location of Candiota Mine makes it important to know more about its coal, aiming the use not only as an energy source but also as a raw material for chemical industries. For this purpose, the chemical composition of the coal extracts must be determined (3). The chemical composition of Brazilian coal is still not well defined, but many studies with this objective have been performed in the past (4-13).

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are present in high levels in coal extracts, exceeding 40% in weight (14), and the identification of these compounds can help in defining a better application for the parent coal and its derivatives, as well as in elucidating its geological origin associated with the coalification process. It is usual to establish a correlation between the relative abundance of aromatic structures and the coalification degree (15). It is currently assumed that PAHs are mainly of pyrolytic origin (16). Besides this origin, PAHs are introduced in the environment through contamination by crude oils, coal tar, or refinery products (petrogenic origin) (17-19). They also can be derived from biogenic precursors like terpenes, pigments, and steroids (20, 21). PAHs are responsible for some of the environmental problems associated with coal processing and mining. These kinds of compounds are produced during the sedimentary rock carbonification and are liberated during the heating of coal in processes such as pyrolysis, combustion, and liquefaction (22).

PAHs are considered byproducts of incomplete combustion. Other sources of PAHs include forest fires, volcanic eruptions, motor vehicles, cooking ovens, asphalt manufacture, fossil-fired furnaces, and cigarettes. They can be formed from any hydrocarbon source if the conditions of incomplete combustion due to lack of oxygen are met (23).

The growing use of fossil fuels has increased the exposure of humans to PAHs. The combustion of coal is one of the major sources of PAHs which tend to be adsorbed on the surface of soot and smoke particles. The relationship between soot and cancer has been recognized since the past century (23).

have very significant chronic toxicity; that is, a single large dose will not cause immediate adverse effects but continuous low doses probably will induce cancer. The carcinogenic properties of PAHs are believed to be due to metabolites formed in the body when these compounds are broken down (24-26). One of the greatest sources of benzo[a]pyrene emissions are coal refuse burning and coke production.

Of the many processes to fractionate fossil fuels, the preparative chromatographic techniques are the most used. In this work, liquid adsorption chromatography using silica and alumina as the stationary phase was applied in order to isolate the PAH fractions from bitumen of Candiota coal. The objectives were to compare the performances of the two solid phases for the isolation of PAHs and to identify the main PAH present in the Candiota coal extract.

## EXPERIMENT

### Sampling

Coal samples were obtained from Candiota Mine (south Brazilian high ash coal) and they were ground down to 60 mesh.

### Coal Extraction

Bitumen was obtained from 30 g of coal submitted to Soxhlet extraction, using toluene as solvent, during 48 hr. After the extraction, excess solvent was removed using a rotary evaporator.

### Solvents and Adsorbents

All solvents were distilled and dried with sodium sulfate. Silica was activated at 140°C and alumina at 400°C, and stored under vacuum. Standard compounds, purchased from Aldrich Company (Milwaukee, WI, USA), were used to identify the main compounds in the samples. Two standard mixtures were made, 1 with 7 saturated linear hydrocarbons and another with 15 PAHs.

### Chromatographic Fractionation Techniques

The fractionation of 300 mg of bitumen was made by two chromatographic processes: (1) adsorption liquid chromatography on 20 g of silica

TABLE 1. Solvents Used in the Fractionation Procedures

Fraction	Compounds	Solvents		Volume (mL.)
		Silica process	Alumina process	
1	Saturated hydrocarbons	Hexane	Hexane	20
2	PAHs	Hexane:benzene (1:1)	Hexane:benzene (1:1)	20
3	Polar compounds	Acetone/THF (2:8)	Methanol	40

PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; THF, tetrahydrofuran.

(ALCS), and (2) adsorption liquid chromatography on 20 g of alumina (ALCA). Three fractions—aliphatic, aromatic, and polar compounds—were obtained in each process, using a proper sequence of eluants as described in Table 1. All procedures were made in triplicate.

### Analysis of the Chromatographic Fractions

Fraction 1 was analyzed in an HP-5890 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) gas chromatograph using flame ionization detector (GC/FID) and fraction 2 was analyzed by gas chromatography with a mass selective detector (GC/MS) (HP-5960/HP-5973, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), equipped with a library search system. Fraction 3 was not analyzed for this article, it being the object of another work. The chromatographic conditions, in GC/FID and GC/MS, are described in Table 2.

TABLE 2. Chromatographic Conditions

	GC/FID	GC/MS
Injection mode	Split 1:100	Splitless
Injection temperature	300 °C	300 °C
Detector temperature	300 °C	300 °C
Initial temperature	120 °C	120 °C
Initial time	5 min	0 min
Rate	3 °C/min	2 °C/min
Final temperature	300 °C	300 °C
Final time	15 min	10 min
Column	HP1 (50 m × 0.32 mm × 0.25 μm)	
Carrier gas	H <sub>2</sub>	He
Ionization mode	—	Electron impact (70 eV)

GC/FID, gas chromatography with flame ionization detector; GC/MS, gas chromatography coupled to mass spectrometry.

## RESULTS

A mass yield of 0.29% of bitumen was achieved in the coal extractions, showing low dissolved organic matter. The bitumen elemental analysis presented the following values: 83.80% carbon, 0.42% nitrogen, 8.30% hydrogen, and 7.50% oxygen (by difference).

Figure 1 shows the mass distribution of each fraction from the silica and alumina preparative chromatographic procedures. It can be observed that the fractionation on silica gives equivalent quantities of saturated and aromatic fractions. Compared with the fractionation in alumina, an increase in the aromatic fraction and a decrease in saturated fraction can be verified. This fact indicates a better performance in relation to the aromatic compounds.

Figure 2 shows the chromatograms (GC/FID) of fraction 1 of both methods of extraction (Figure 2a, ALCA and b, ALCS) and Figure 3 shows the chromatograms (GC/MS) of fraction 2 of both methods of extraction (Figure 3a, ALCA and b, ALCS). The better performance of ALCA in relation to the aromatic compounds is reinforced by observing Figure 3a and b, which shows the aromatic fraction chromatograms in alumina and silica, respectively. It can be noted that the abundance of aromatic compounds in the alumina process is superior to that in silica.

The complex character of these chromatograms, probably due to the presence of methyl and polymethyl substituted PAHs, can also be observed. Table 3 gives the name of compounds appearing in Figures 2b

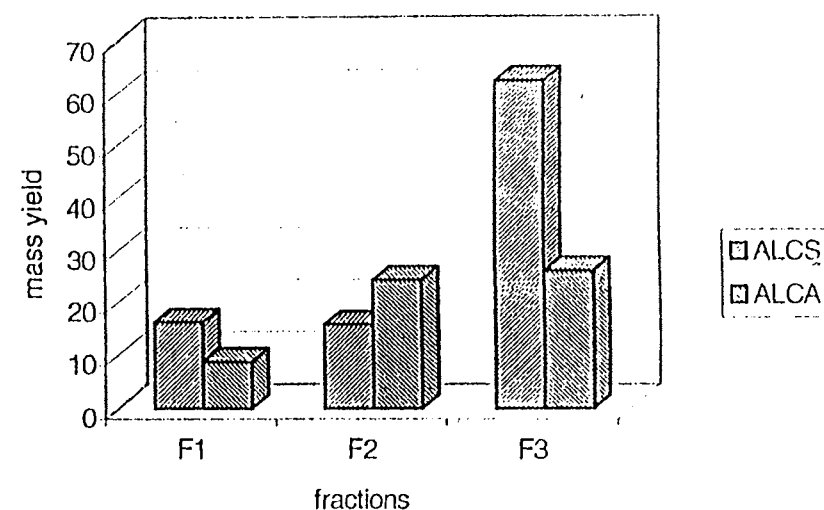


FIGURE 1. Mass distribution of the chromatographic fractionation of coal extract.

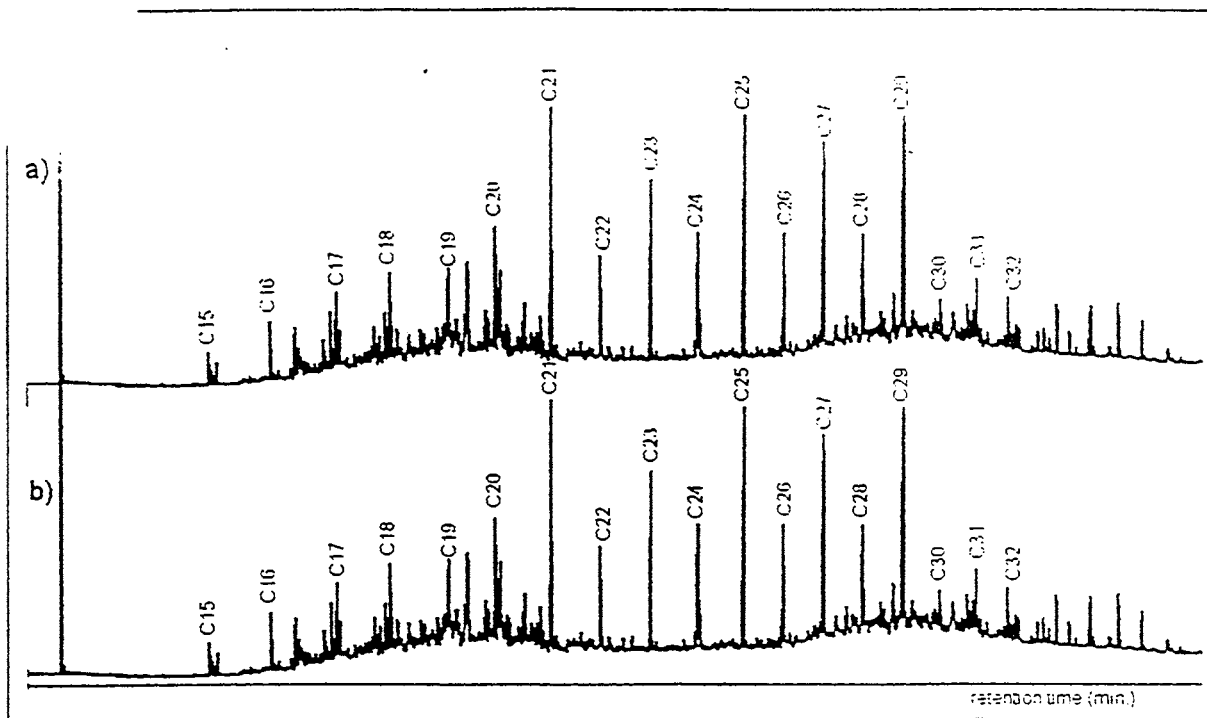


FIGURE 2. Chromatograms (GC/FID) of fraction 1 of toluene bitumen fractionated (a) on alumina and (b) on silica.

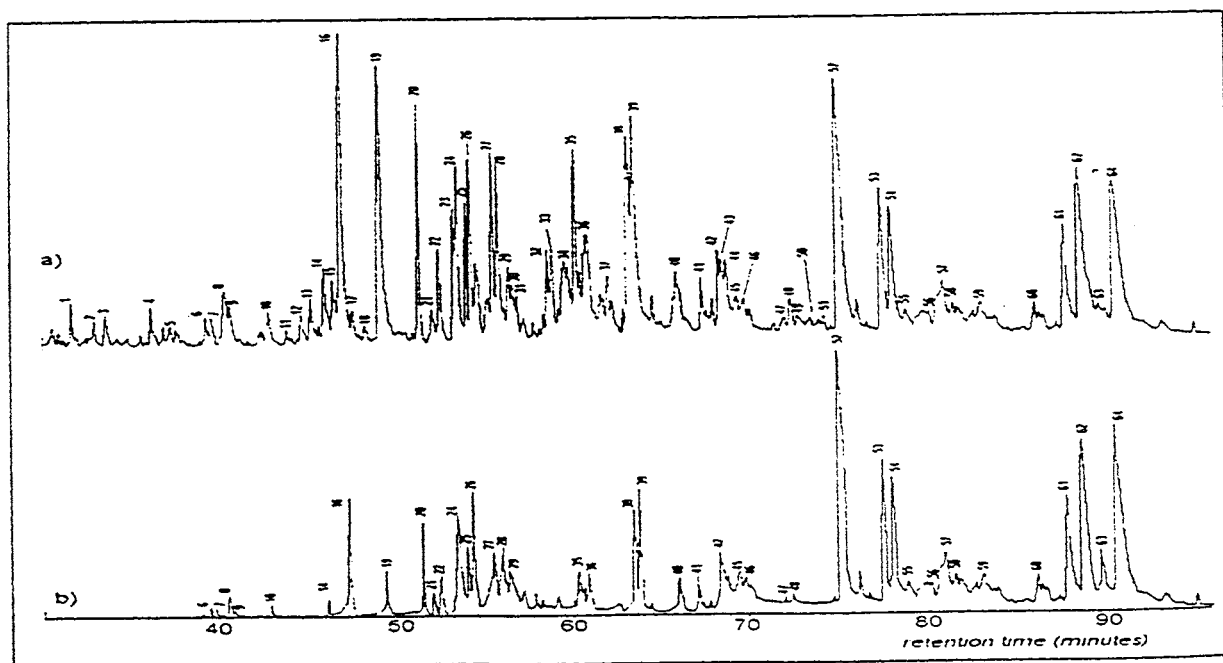


FIGURE 3. Chromatograms (GC/FID) of fraction 2 of toluene bitumen fractionated (a) on alumina and (b) on silica.

and 3b. Sixty-four aromatic compounds were identified, among them pollutants such as pyrene, benzo[*a*]pyrene, chrysene, and fluoranthene, as well as several compounds with more than four condensed rings. The relatively high concentration of unsubstituted PAHs, including fluoranthene (peak 16), pyrene (peak 19), benzo[*a*]anthracene (peak 38), chrysene (peak 39), and benzo[*b*]fluoranthene (peak 52), when compared to their alkylated homologues suggests that the coal was submitted to high temperatures and pressure, during the coalification process, resulting in an increase in aromatization and dealkylation of the aromatic system partially hydrogenated (14).

In Figure 2a and b, that shows the capillary gas chromatograms of saturated hydrocarbons in fraction 1 from the bitumen in alumina

TABLE 3. Peak Identification of Fraction 2 (Figures 2b and 3b)

Peak	MW/(AMU) <sup>a</sup>	Identification <sup>b</sup>
1	184	C <sub>3</sub> -naphthlene
2	182	C <sub>2</sub> -biphenyl
3	178	Phenanthrene
4	178	Anthracene
5	204	Phenylanththalene
6,7	192	C <sub>1</sub> -phenanthrene/anthracene
8-10	224	C <sub>3</sub> -biphenyl
11-15	206	C <sub>2</sub> -phenanthrene/anthracene
16	202	Fluoranthene
17, 18	218	C <sub>1</sub> -phenylanththalene
19	202	Pyrene
20	218	C <sub>1</sub> -phenylanththalene
21-31	216	Methylpyrene/methylfluoranthene
32-37	230	Terphenyl
38	228	Benzo[ <i>a</i> ]anthracene
39	228	Chrysene
40-42	242	C <sub>1</sub> -benzanthracene/chrysene
43-51	256	C <sub>2</sub> -benzanthracene/chrysene
52	252	Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthene
53	252	Benzo[ <i>k</i> ]fluoranthene
54	252	Benzo[ <i>a</i> ]pyrene
55-59	266	C <sub>1</sub> -benzopyrene
60	278	Benzoperylene
61, 62	276	Indene[1,2,3- <i>cd</i> ]pyrene
63	278	Dibenzanthracene
64	276	Benzo[ <i>ghi</i> ]perylene

<sup>a</sup>Used for the single ion monitoring in the GC/MS.

<sup>b</sup>Compounds tentatively identified.

and in silica, respectively, the identified linear saturated hydrocarbons are indicated by the letter C with an numerical index that represents the number of carbons in the molecule. It can be observed that, in fraction 1, saturated hydrocarbons with an odd number of carbons predominate over hydrocarbons with an even number of carbons. This is indicative of the classification of Candiota coal as a low-rank coal.

## CONCLUSIONS

From the obtained results, it is possible to conclude that alumina performs better than silica in the separation of PAHs from bitumen samples. The proposed procedure is fast and low solvent consuming. Candiota bitumen is rich in PAHs with high amounts of potentially mutagenic and carcinogenic compounds, like those with four, five, or more condensed rings.

## REFERENCES

1. N. Gangoli and G. Thodos, Liquid Fuels and Chemical Feedstocks from Coal by Supercritical Gas Extraction. *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development* 16 (1977):208-216.
2. A. A. Muller, *Analytical Profile of Coal*, 2nd ed. (Brazil: DNPM, 1978).
3. E. O. Rhodes, "The Chemical Nature of Coal Tar." In *Chemistry of Coal Utilization*, Vol. 1, ed. H. H. Lowry (New York: John Wiley and Sons, 1945).
4. E. B. Caramão, L. M. F. Gomes, M. D. Oliveira, and E. M. Lanças, CGC-MS Characterization of Tar Bases from a Brazilian High Ash Coal. *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatographic Communications* 10 (1987):579-581.
5. E. B. Caramão, L. M. F. Gomes, M. D. Oliveira, A. Bristoti, and E. M. Lanças, Characterization of Medium Distillate Cut (100-230 °C) Oil from high Ash 'Mina do Leao' Brazilian Coal Tar. *Fuel Science and Technology International* 8 (1990):173-176.
6. E. B. Caramão, L. M. F. Gomes, M. D. Oliveira, A. Bristoti, and E. M. Lanças, Selective Isolation and Characterization of 'Mina do Leao' Coal Tar Bases. *Fuel Science and Technology International* 8 (1990):881-898.
7. E. M. Lanças and E. B. Caramão, Chemical Analysis of High Ash Brazilian Coal Tar. I. Preparative Liquid Chromatographic Fractionation. *Fuel Science and Technology International* 10 (1992):1197-1205.
8. E. M. Lanças and E. B. Caramão, Chemical Analysis of High Ash Brazilian Coal Tar. II. Acid/Basic/Neutral Separation of Resins. *Fuel Science and Technology International* 14 (1996):417-426.
9. E. M. Lanças and E. B. Caramão, Chemical Analysis of High Ash Brazilian Coal Tar. III. Hydrocarbon Characterization. *Fuel Science and Technology International* 14 (1996):427-450.



10. T. M. Pissolatto, P. Schossler, A. M. Geller, E. B. Caramão, and A. F. Martins, Identification of Phenolic Compounds in Waste Water From Coal Gasification Using SPE and GC/MS. *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatographic Communications* 19 (1996):577-580.
11. C. Dariva, J. V. Oliveira, M. G. R. Vale, and E. B. Caramão, Supercritical Fluid Extraction of a High-Ash Brazilian Coal. *Fuel* 76 (1997):585-591.
12. M. G. R. Vale, L. P. Luz, A. F. Martins, E. B. Caramão, C. Dariva, and J. V. Oliveira, Comparison of SFE, Soxhlet and Sonication Methods for the Extraction of Organic Material in Mineral Coal. *Journal of Microcolumn Separations* 10 (1998):259-263.
13. C. Dariva, J. V. Oliveira, J. C. Pinto, M. G. R. Vale, and E. B. Caramão, Evaluation of the Effects of Process Variables on the Characteristics of the Products from SCFE of a Brazilian Mineral Coal by Statistical Methods. *Journal of Supercritical Fluids* 13 (1998):343-350.
14. C. M. White, *Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, ed. A. Bjorseth (Oslo, Norway: Central Institute for Industrial Research, 1983).
15. M. Radke, H. Willsch, D. Leythaeuser, and M. Taichmüller, Aromatic Components of Coal—Relation of Distribution Pattern to Rank. *Geochimica Cosmochimica Acta* 43 (1982):1831-1846.
16. H. Budzinski, I. Jones, J. Bellecq, C. Piérard, and P. Garrigues, Evaluations of Sediment Contamination by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Gironde Estuary. *Marine Chemistry* 58 (1997):85-97.
17. J. L. Lake, C. Norwood, C. Dimock, and R. Bowen, Origins of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Estuarine Sediments. *Geochimica Cosmochimica Acta* 43 (1979):1847-1854.
18. S. Sporstol, N. Gjøs, R. G. Lichtenthaler, K. O. Gustovsen, K. Urdal, E. Oreld, and J. Skel, Source Identification of Aromatic Hydrocarbons in Sediments Using GC/MS. *Environmental Science and Technology* 17 (1983):282-286.
19. E. G. Merrill and T. L. Wade, Carbonized Coal Products as a Source of Aromatic Hydrocarbons to Sediments from a Highly Industrialized Estuary. *Environmental Science and Technology* 19 (1985):597-603.
20. R. E. Laflamme and R. A. Hites, Tetracyclic and Pentacyclic Naturally Occurring Aromatic Hydrocarbons in Recent Sediments. *Geochimica Cosmochimica Acta* 43 (1979):1687-1691.
21. S. G. Wakeham, C. Schallner, and W. Giger, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Recent Lake Sediments. 2. Compounds Derived from Biogenic Precursors During Early Diagenesis. *Geochimica Cosmochimica Acta* 44 (1980):415-429.
22. R. A. Duric, Coal Properties and their Importance in the Production of Liquids Fuels—An Overview. *Fuel* 61 (1982):883-888.
23. P. O'Neill, *Environmental Chemistry*, 2nd ed., eds. Chapman and Hall, 1993.
24. G. W. Kelly, K. D. Bartle, and A. A. Clifford, Identification and Quantitation of Polycyclic Aromatic Compounds in Air Particulate and Diesel Exhaust Particulate Extracts by LC-GC. *Journal of Chromatographic Science* 31 (1993):73-76.
25. S. E. Zakrzewski, *Principles of Environmental Toxicology*. ACS Professional Reference Book, 1991.

## CONTAMINATION OF SOIL BY POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SOME URBAN AREAS

Z. Saltiene  
D. Brukstiene  
A. Ruzkyte

Centre of Environmental Medicine, Institute of Hygiene,  
Lithuanian Ministry of Health, Vilnius, Lithuania

The contamination by 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface soils, sampled at a 0-5 cm depth in the urban areas of Tallinn, Helsinki, Vilnius, Chicago, London is reported. All samples were analyzed using the same protocol. The median concentrations ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) were found to be 117, 539, 127, 3,263, 1,728 for pyrene; 62, 236, 43, 1,634, 1,652 for benzo[a]pyrene; 86, 304, 92, 2,295, 2,068 for benzo[a]pyrene toxic equivalents, calculated using the benzo[a]pyrene toxic equivalency factors; 467, 1,471, 392, 8,981, 6,837 for a total of seven probable human carcinogenic PAHs: benzo[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, dibenz[ah]anthracene, indeno[1,2,3-cd]pyrene; 911, 2,941, 672, 16,183, 13,718 for the total of 16 PAHs, recommended by the U.S. Environmental Protection Agency: naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene,

Received 9 January 2001; accepted 26 May 2001.

The authors thank Juozas Biveinis for discussions and Violeta Dumskiene for technical assistance. Special thanks go to Gerry Ioannides, Zande Environmental Service, Inc., for standards of PAH-contaminated soils; Vacys Saulys, U.S. Environmental Protection Agency Region 5, for literature support; the World Health Organization, Jonas Virpsa, and Ron Oleka for supporting travel and collecting samples in the cities.

Address correspondence to Daiva Brukstiene, Institute of Hygiene, Centre of Environmental Medicine, Lithuanian Ministry of Health, Didzioji 22, Vilnius, Lithuania.

# QUÍMICA NOVA

Revista da Sociedade Brasileira de Química

IQUSP - Bloco 3 S. - Caixa Postal 26.037, 05513-970 São Paulo - SP  
fone (11) 3032-2299 fax (11) 3814-3602 e-mail sbqedit@iq.usp.br

São Paulo, 05 de setembro de 2002

Ilmo(a) Sr(a).  
Prof(a) Dr.(a) Elina B. Caramão  
IQ - UFRGS  
Av. Bento Gonçalves, 9500  
90160-970 Porto Alegre - RS

Ref. QN 052/02

Prezado(a) Prof.(a). Elina,

Comunicamos a V. Sa. que seu manuscrito "Pré-concentração de Nitrosaminas a Partir de..." foi aceito para publicação em *Química Nova*, com as correções indicadas pelo Assessor 1 e pela editoria (vide manuscrito anexo):

- Incluir "abstract".
- Incluir o título em inglês.
- Corrigir as referências seguindo as novas normas para 2002, verificando também as abreviações das revistas (vide home page da SBQ: <http://www.s bq.org.br> no site de QN).
- No disquete, enviar arquivo de texto separado do arquivo contendo figuras, tabelas, gráficos, etc. (ver normas da revista)
- Indicar, em carta à editoria, se assumirão com os custos de publicação de Figura(s) colorida(s), que deverão ser pagos quando receberem a prova tipográfica.
- Envie a versão final em disquete (3½" ou em CD) digitado em Word for Windows (VERIFICAR NORMAS), juntamente com uma cópia impressa.

Atenciosamente,

*Priscila Gil*

Editoria de Química Nova

**PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE NITROSAMINAS A PARTIR DE AMOSTRAS AQUOSAS  
POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA CAPILAR  
ELETROCINÉTICA MICELAR**

**Pedro José Sanches Filho**

Centro Federal de Educação Tecnológica do Rio Grande do Sul, Praça Vinte de Setembro,  
455, 96015-000, Pelotas – RS.

**Kelen Daiane Zanin e Elina Bastos Caramão\***

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves,  
9500, 90160-970, Porto Alegre – RS.

**Ronaldo Caramão Garcia**

Departamento de Saúde Ocupacional, Prefeitura Municipal de Pelotas, Rua Quinze de  
Novembro, 607, 96015-000, Pelotas-RS.

**Angel Rios e Miguel Valcárcel**

Departamento de Química Analítica e Ecologia, Campus Rabanales Edifício Anexo C3,  
Universidade de Córdoba E-1407- Espanha

\* e-mail: [elina@vortex.ufrgs.br](mailto:elina@vortex.ufrgs.br)



## PRE CONCENTRATION OF NITROSAMINES FROM AQUEOUS SAMPLES BY SPE AND MEKC

This paper describes the development of a methodology for solid phase extraction (SPE) and pre-concentration of nitrosamines from aqueous samples using granular activated charcoal as stationary phase. Micelar Electrokinetic Capillary Chromatography (MEKC) was used for the separation and identification of the nitrosamines in the extracts. Using a sample with  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  of each nitrosamines standards (dimethylnitrosamine, DMN; diethylnitrosamine, DEN; N-nitrosopyrrolidine, NPYR; N-nitrosopiperidine, NPIP; N-nitrosomorpholine, NMOR), the methodology showed a range of recuperation from 29 to 107 % with a linear zone between  $10$  and  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ . The developed methodology can be applicable to the determination of these analytes in different aqueous samples.

Keywords: nitrosamines; SPE; active charcoal

## INTRODUÇÃO

O termo nitrosaminas reúne uma grande variedade de tipos estruturais de compostos de diferentes pesos moleculares, que surgem como produtos da reação de aminas ou aminoderivados com agentes nitrosantes. A característica estrutural comum<sup>1-3</sup> é a presença do grupo funcional N-NO, incluindo nitrosaminas e nitrosamidas. Esta classe de compostos, muitos dos quais carcinogênicos, foi estudada em vários materiais<sup>3-14</sup> como gêneros alimentícios, produtos farmacêuticos, amostras ambientais (água, solo, ar etc.), pesticidas, herbicidas, borracha, cosméticos etc. Em função do potencial mutagênico e carcinogênico destes compostos em animais, estima-se que o nível de exposição tolerável pelo homem para as nitrosaminas mais voláteis encontra-se na faixa de 5 a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , por esta razão o limite de detecção mínimo de 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  é geralmente aceito<sup>1-3</sup>.

A determinação de contaminantes traços tais como as nitrosaminas requer o isolamento e subsequente concentração do analito a partir da matriz a fim atingir limites de detecção mais baixos<sup>1,2</sup>. A extração em fase sólida (EFS), uma técnica bastante atual, é adequada para muitas amostras com contaminantes em nível de traços, requer aparelhagem simples e proporciona um *clean up* superior à extração líquido-líquido, reduz substancialmente o consumo de solvente e o tempo requerido para o preparo da amostra para análise. O custo do material em EFS, por amostra, é igual e em muitos casos mais baixo que a correspondente extração líquido-líquido<sup>14,15</sup>.

Neste trabalho utilizou-se a EFS, tendo como fase sólida o carvão ativo granular. O carvão ativo, o mais popular dos adsorventes, é tradicionalmente utilizado para remoção de odores, sabores e cor, causados por contaminantes traços. Sua alta capacidade adsortiva e versatilidade permitiram expandir sua aplicação ao tratamento de numerosos resíduos industriais. Em geral compostos orgânicos com pesos moleculares maiores que  $45 \text{ g Mol}^{-1}$ , são bons adsorbatos em carvão ativo<sup>15-17</sup>.

As nitrosaminas são normalmente analisadas por cromatografia gasosa com detectores específicos. O TEA (Thermal Energy Analyser) é indicado na literatura como o detector de escolha para análise de nitrosaminas, em função da sua elevada especificidade. Entretanto, para operar continuamente, esta técnica tem alto custo inicial, requer o uso de *traps* resfriados para remoção do eluente e co-produtos formados durante a pirólise<sup>1,14</sup>, possui uso restrito e é suscetível a muitas interferências<sup>1</sup>. Em função disto busca-se métodos mais simples e mais baratos. A cromatografia capilar eletrocínética micelar (CCEM) tem se mostrado altamente eficiente, rápida e flexível como técnica de separação analítica. Sua alta eficiência permite seu emprego em muitas aplicações tais como análise de proteínas, compostos farmacêuticos e poluentes ambientais<sup>18,19</sup>.

No presente trabalho desenvolveu-se uma metodologia para extração, pré concentração e análise de nitrosaminas em matrizes aquosas usando a combinação da EFS com carvão ativo e CCEM, ampliando assim as aplicações da eletroforese capilar como técnica de análise, utilizando equipamentos comerciais e capilares de sílica.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram grau analítico, ou superior. Ácido Clorídrico, Hidróxido de Sódio (utilizados no acondicionamento do capilar), Diidrogenofosfato de Sódio, Tetraborato de Sódio, Ácido Fosfórico,  $\gamma$ -ciclodextrina, Lauril Sulfato de Sódio – LSS (utilizados na otimização do tampão), assim como os padrões de nitrosaminas (99,99% de pureza) Dimetilnitrosamina – DMN, Dietilnitrosamina – DEN, N-nitrosopirrolidina – NPIR, N-nitrosomorfolina – NMOR, N-nitrosopiperidina – NPIP foram adquiridos da Fluka e Sigma, assim como os solventes acetona e diclorometano, ambos grau HPLC, utilizados na EFS. A Figura 1 apresenta as estruturas químicas dos padrões utilizados.

Carvão ativo granular 8-20 mesh, foi purificado por extração em sóxhlet com diclorometano (DCM), por 24 h, e seco em estufa a 105 °C, por 4 h. Soluções estoque foram preparadas a partir de cada padrão de nitrosamina a 1000 mg mL<sup>-1</sup> em metanol.

Soluções de trabalho: Foram usadas soluções aquosas de padrões de nitrosaminas (10 a 1200  $\mu$ g L<sup>-1</sup>), preparadas a partir de diluições da solução estoque com água ultrapura (Milli Q- System Millipore, Bedford, MA).

### Equipamentos

Os experimentos foram conduzidos em um equipamento de eletroforese capilar Beckman P/ACE 5500 CE Instruments com detector de arranjo de diodos UV-Vis e um capilar de sílica fundida (50 cm X 75  $\mu\text{m}$  - Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) foi usado para separação e quantificação dos analitos. O sistema compreende uma fonte geradora de tensão 0 – 30 kV e o software PACE para o processamento e registro dos dados.

## **Procedimentos**

### **Extração em Fase Sólida (EFS):**

Baseado em dados da literatura e também nos resultados obtidos para o carvão em pó,<sup>20</sup> foi utilizado 1 g de massa de adsorvente e 200 mL de amostra. Otimizou-se o fluxo da amostra aquosa através do leito de carvão ativo, no processo de adsorção, utilizando uma amostra sintética aquosa (mistura de padrões), em diferentes concentrações. Esta mesma mistura foi submetida a todo o processo de extração e análise após todas as variáveis terem sido otimizadas, para avaliar a exatidão do mesmo.

Procedimento: 1 g de carvão ativo granular foi agitado por 10 min com 20 mL de água MiliQ e empacotado em uma coluna de vidro (20 cm X 11 mm). O excesso de água foi retirado. Através desta coluna diferentes volumes (25, 100, 200 mL) de soluções de trabalho aquosas, em um intervalo de concentração entre 10 a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , foram percoladas. A dessorção dos compostos do adsorvente foi feita por

eluições sucessivas com 10 mL de acetona, 10 mL de DCM e um volume adicional de 10 mL de DCM.

As frações foram concentradas sob fluxo de nitrogênio em banho de gelo, para minimizar as perdas dos analitos mais leves. Os volumes foram corrigidos para 5 mL em balão volumétrico com água MiliQ, para análise por CCEM. Todas as análises foram conduzidas em triplicata.

### **Análises por CCEM**

A separação por CCEM foi conduzida em um capilar de sílica a 20 °C. O tampão utilizado para a separação (eletrólito) foi uma solução 50 mMol L<sup>-1</sup> fosfato/borato e 80 mMol L<sup>-1</sup> de LSS cujo pH foi corrigido a 6,6 com uma solução de ácido fosfórico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A voltagem de 10 kV foi utilizada gerando uma corrente média de 80 µA. As amostras foram injetadas usando o modo de injeção eletrocínético aplicando uma voltagem de 10 kV por 10 s. Os eletroferogramas foram registrados a 236 nm. As separações foram conduzidas do anodo para catodo.

Para ativação dos grupos silanóis, o capilar de sílica fundida recém preparado foi submetido a um ciclo de lavagens padrão, de acordo com o seguinte procedimento: solução aquosa de HCl 1 Mol L<sup>-1</sup> foi passada através do capilar durante 5 minutos seguida de NaOH 0,1 Mol L<sup>-1</sup> (10 min) e água MiliQ (5 min). Para a manutenção do capilar em boas condições de trabalho, sua superfície foi regenerada uma vez ao dia por lavagens consecutivas com água MiliQ (5 min)

seguida por NaOH 0,1 Mol L<sup>-1</sup> recentemente preparado (5 min), água MiliQ (5 min) e tampão recentemente preparado (20 min).

O pico de cada analito foi identificado através da comparação dos tempos de migração obtidos a partir da análise dos padrões .

### **Método EFS-CCEM**

Para avaliar o método eletroforético combinado com o processo de pré-concentração otimizado, foram construídas curvas de calibração no intervalo de 10 a 1000 µg L<sup>-1</sup>. Cada ponto da curva corresponde ao valor médio obtido a partir de, pelo menos, três medidas independentes de áreas. O limite de detecção (LD) foi calculado pelo uso de três vezes o desvio padrão do coeficiente linear dividido pelo coeficiente angular, enquanto que o limite de quantificação foi calculado pelo uso de 10 vezes o desvio padrão do coeficiente linear dividido pelo coeficiente angular<sup>21</sup>.

A exatidão do processo de pré – concentração foi estudada através da análise de uma solução aquosa padrão. Estudos de recuperação foram desenvolvidos a partir de soluções de trabalho aquosas em intervalos de 10 a 1000 µg L<sup>-1</sup>. A análise de 200 mL de uma amostra contendo 50 µg L<sup>-1</sup> de DMN, DEN, NPIR, NMOR e NPIP foi repetida 11 vezes para o cálculo do desvio padrão relativo percentual (% DPR).

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## EFS

O estudo da EFS usando carvão ativo em pó já foi testado em nosso laboratório<sup>20</sup>, apresentando bons resultados para o isolamento de nitrosaminas em amostras aquosas. Entretanto, este processo implica na utilização da metodologia em batelada devido à impossibilidade de operação em coluna, causada pela pequena granulometria (100 a 400 mesh) a qual dificulta a eluição, resultando em separações extremamente demoradas. Este procedimento de EFS é, também, muito trabalhoso, lento e expõe o processo a maiores riscos de contaminação. Por outro lado, o uso do carvão granular permite trabalhar no processo de leito fixo (em coluna), minimizando as dificuldades e contaminações associadas ao processo em batelada.

A Figura 2 apresenta os dados relativos à variação da recuperação obtida para o método usando todo o conjunto de nitrosaminas, em função da vazão da amostra através da coluna. Observou-se que o fluxo de  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$  proporciona melhores recuperações. Quando o processo é conduzido com a máxima vazão,  $5,0 \text{ mL min}^{-1}$  (torneira totalmente aberta), ocorre redução significativa nas áreas dos compostos NPIP, NPIR, DEN, indicando a necessidade de tempo de contato um pouco maior.

### **Estudo das recuperações para carvão granular e saturação da fase**



A Tabela 1 apresenta as variações de recuperação obtidas variando-se o volume e a concentração das amostras sintéticas. Os valores de recuperações encontram-se dentro da faixa obtida pelo método oficial EPA 8070A<sup>22</sup> recomendado para análise de nitrosaminas em amostras aquosas. Observa-se, nesta tabela, que análise direta por CCEM das amostras após o processo EFS (águas residuais) permitiu a detecção dos compostos DMN e NMOR, a partir de 25 mL de uma amostra sintética contendo 20 µg de cada nitrosamina, indicando que as mesmas não foram totalmente retidas na coluna. Isto foi confirmado no estudo de amostras sintéticas onde a massa de cada nitrosamina foi aumentada cerca de 100 vezes (200 mL da solução 200 µg L<sup>-1</sup>). A percentagem de recuperação neste caso é reduzida à medida em que a percentagem de compostos que permanecem junto à água residual sofre um incremento.

O aumento do volume de amostra a ser percolada de 25 para 200 mL favoreceu o estudo de faixas de concentração mais baixas, porém o composto DMN (menor massa molecular e maior polaridade) parece sofrer um lixiviamento indicado pela queda na percentagem de recuperação quando se passa de 25 para 200 mL de amostra.

As baixas recuperações apresentadas pelos compostos DMN, NPIR e NMOR se explicam por sucessivas perdas durante os processos de troca de solvente e redução de volume, e, principalmente, durante a adsorção a partir do extrato aquoso, em função da elevada polaridade.

## Caraterização do método

A Tabela 2 apresenta as equações resultantes da regressão linear e os principais parâmetros para caracterização do método EFS analisado por CCEM, obtidos a partir da construção de curvas de calibração por pré-concentração de 200 mL de misturas sintéticas, utilizando carvão ativo granular. Os limites de detecção, linearidade e reprodutibilidade da metodologia são aceitáveis para a variedade de analitos estudados na faixa de concentração de 10 a 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Observa-se que os limites de detecção variaram entre 9,6 – 3,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , estando de acordo com o exigido como pré-requisito para análise de nitrosaminas<sup>1-3</sup>. Como os limites de detecção foram calculados a partir do desvio padrão do coeficiente linear, uma maior concordância dos resultados implica em menores valores de LD e LQ (limite de quantificação). Os valores de %DPR entre 5,6 e 13,6%, considerados baixos para a faixa de concentração analisada, demonstram repetibilidade aceitável do método, como consequência principal da facilidade de dessorção dos analitos, pelos solventes utilizados. Isto pode ser melhor visualizado na Figura 3, a qual apresenta a comparação dos eletroferogramas dos eluatos de acetona, diclorometano e água residual (amostra após passagem através da coluna de carvão ativo). Mesmo sendo obtidos partir da pré concentração de 200 mL de uma amostra sintética a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , observa-se que quase a totalidade dos analitos foram dessorvidos pela acetona. A Tabela 2 também evidencia, através dos valores dos coeficientes angulares, que o método é mais sensível para os compostos DEN, NPIR, NPIP, como consequência direta

de seus elevados teores de recuperação e resposta na detecção espectrofotométrica utilizada no CCEM. De modo geral os coeficientes de semelhança ( $R^2$ ) indicam que as equações encontradas se ajustam em mais de 99,2% para explicar a relação entre área e concentração para os analitos estudados. Os valores de  $S_{y/x}$ , por sua vez, indicam baixa incerteza no dado obtido.

## CONCLUSÃO

O método desenvolvido permitiu a extração, pré-concentração e análise das nitrosaminas em níveis de  $\mu\text{g L}^{-1}$  em amostras aquosas. A aplicação da metodologia a amostra sintética apresentada na Tabela 3, permitiu a determinação dos analitos com um erro relativo variando entre 1,6 a 8%, conforme pode ser observado. O maior erro encontrado corresponde ao composto DMN que na mistura está em menor concentração e também está sujeito a maiores perdas durante o processo.

O tempo total de análise e a eficiência do método usado encontram-se dentro de valores aceitáveis para a análise de amostras aquosas como as aqui propostas. Embora apresente alta eficiência, e sensibilidade para separação dos compostos, a detecção espectrofotométrica carece da especificidade necessária a análise de nitrosaminas. Isto poderá ser superado em equipamentos acoplados com detectores de massas.

## REFERÊNCIAS

1. Ikeda, K.; Migliorese, K. G.; *J. Soc. Cosmetic. Chem.* **1990**, *41*, 283.
2. Sen, N. P. Em *Toxic Constituents of Animal Foodstuffs*; Liener, I.E, ed.; Academic Press: New York, 1974, p. 132.
3. Charpentier, S.; *The Ecologist* **2001**, *Abril*, 54.
4. You, J.; Fan, X.; Lao, W.; Ou, Q.; Zhu, Q.; *Talanta* **1999**, *48*, 437.
5. Zwickenpflug, W.; Ritcher, E.; *J. Chromatogr. Sci.* **1987**, *25*, 506.
6. Oliveira, C. P.; Glória, M. B. A.; Barbuor, J. F.; Scalan, R. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 967.
7. Sen, N. P.; Seaman, S. W.; Baddoo, P. A., Weber, D.; *J. Food Sci.* **1988**, *53*, 731.
8. Maxwell, R. J.; Pensabene, J. W; Fiddler, W.; *J. Chromatogr. Sci.* **1993**, *31*, 212.
9. Tomkins, B. A.; Griest, W. H.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2533.
10. Fine, H. D.; Ross, R.; Rounbehler, D. P.; Silvergleid, A.; Song, L.; *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24(5)*, 1069.
11. Sen, N. P.; Seaman, S. W.; Page, B. D.; *J. Chromatogr. A*, **1997**, *788*, 131.
12. Glória, M. B. A.; Barbour, J. F.; Scalan R. A.; *J. Agric Food Chem.* **1997**, *45*, 814.
13. Stephany, R. W.; Freudenthal, J.; Egmond, E.; Gramberg, L.; Schuller, P. L.; *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 536.
14. Fu, C.; Xu, H.; *Analyst* **1995**, *120*, 1147.

15. Noll, K. E.; Gounaris, V.; Hou, W-S.; *Adsorption Technology for Air and Water Pollution Control*, Lewis Publishers Inc : Michigan, 1992, p 1.
16. Martin, R. J.; Shackleton, R. C.; *Water Res.* **1990**, *24*, 477.
17. Borghesani, G.; Locatelli, V. L.; *Ann. Chim.* **1983**, *73*, 137.
18. Altria K. D.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *856*, 443.
19. Dabek – Zlotorzynska, E.; *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2453.
20. Sanches Filho, P. J.; Caramão, E. B.; Zanin, K. D.; *Resumos do VIII Congresso Latinoamericano de Cromatografia (COLACRO)*, Buenos Aires, Argentina, 2000.
21. Arce, L.; *Tese de Doutorado*, Universidade de Córdoba, Espanha, 1998.
22. <http://www.epa.gov/epahome/index/nameindx3.htm>, acessada em Março 2002.

## Legenda das Figuras:

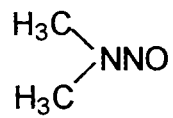
**Figura 1.** Fórmula estrutural das nitrosaminas estudadas neste trabalho

**Figura 2.** Influência da vazão sobre a EFS das nitrosaminas usando 1 g de carvão ativo granular

**Figura 3.** Eletroferogramas resultantes da análise de 200 mL de uma amostra sintética ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) fracionada por EFS

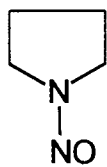
(a) eluato com acetona, (b) eluato com diclorometano e (c) água residual analisada diretamente.

Figura 1



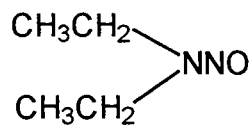
Dimetilnitroamina

DMN



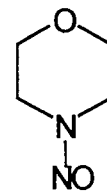
N-Nitrosopirrolidina

NPIR



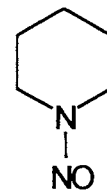
Dietyl nitrosamina

DEN



N-Nitrosomorfolina

NMOR



N-Nitrosopiperidina

NPIP

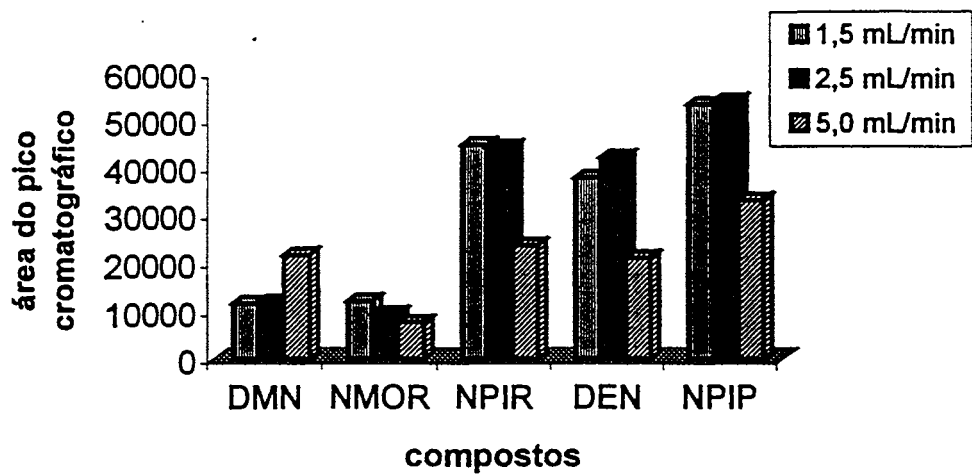


Figura 2



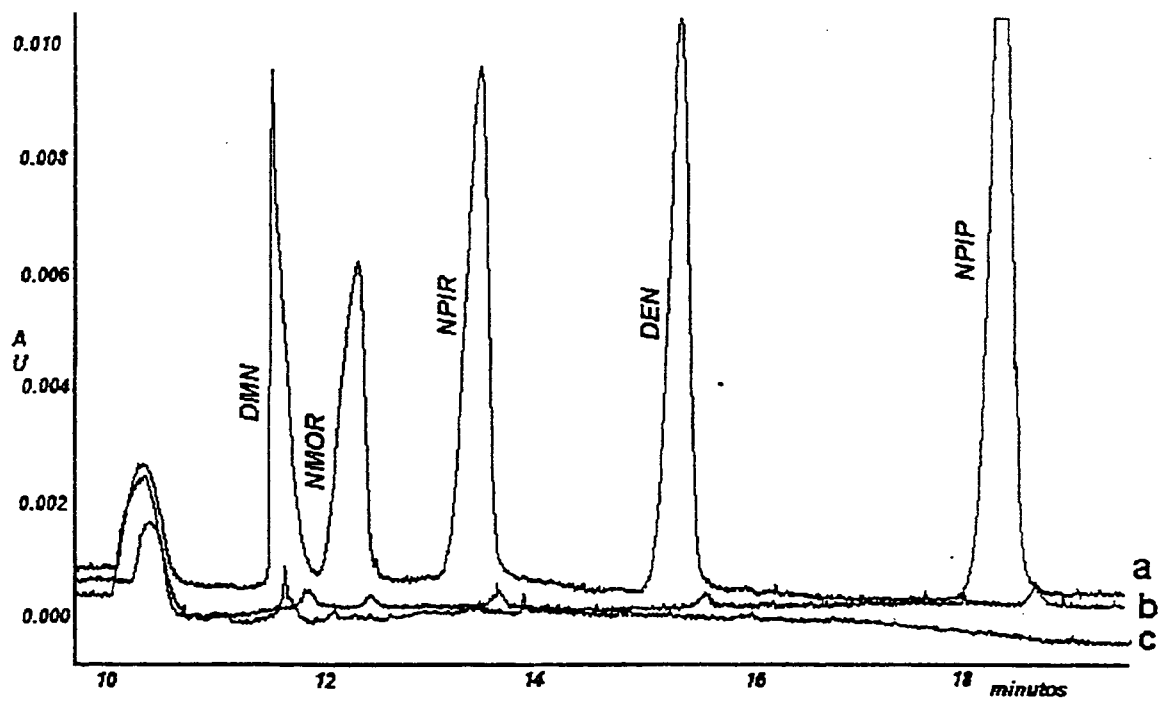


Figura 3

**Tabela 1.** Estudo das recuperações para EFS utilizando carvão granular

	20µg de cada analito 25 mL de amostra (800 µg L <sup>-1</sup> )		Análise direta		10 µg g de cada analito 200 mL de amostra (50 µg L <sup>-1</sup> )		200µg de cada analito 200mL de amostra (1000µg L <sup>-1</sup> )		Análise direta	
	% Rec.	%DP	% - Água residual	% DP	% Rec.	%DP	% Rec.	%DP	% - Água residual	% DP
DMN	71,2	3,1	29,2	1,0	29,3	5,6	19,3	6,4	50,2	4,2
NMOR	37,1	2,8	10,0	9,0	51,6	13,6	21,6	2,62	58,7	2,1
NPIR	66,8	2,3	Nd <sup>*</sup>		58,0	10,0	42,0	1,18	13,1 <sup>*</sup>	2,4
DEN	78,3	2,0	nd		81,8	11,4	39,6	0,00	nd	
NPIP	103,6	4,0	nd		107,6	12,8	39,2	1,64	nd	

\* nd: não detectado

Rec.: Recuperação

DP: Desvio padrão

**Tabela 2. Caracterização do método EFS/CCEM***(Volume de amostra = 200,0 mL)*

Analitos	equação $Y=a + bx$	r	R <sup>2</sup>	S y/x	LOD	LOQ	RSD %
DMN	a=101,59 ±150,4 b=47,9 ± 1,32	0,996	99,2	332,60	9,4	31,3	5,6
NMOR	a=1173,35 ±79,1 b=69,7 ±0,69	0,999	99,9	174,9	3,4	11,34	13,6
NPIR	a=1769,1 ±304,9 b=94,09 ±2,68	0,993	99,2	517,16	9,6	32,4	10,0
DEN	a=1565,9 ±303,4 b=96,01 ±2,69	0,996	99,2	671,17	9,5	31,6	11,4
NPIP	a=1411,6±224,8 b=146,0 ±1,98	0,999	99,8	497,19	4,6	15,4	12,8

a: coeficiente de correlação linear; b:coeficiente angular; S x/y: Desvio padrão dos resíduos; r: coeficiente de correlação linear; R<sup>2</sup>: coeficiente de semelhança (%) obtidos pela análise da variância (ANOVA) para validação do método; LD limite de detecção; LQ limite de quantificação (LD e LQ em  $\mu\text{g L}^{-1}$ )

**Tabela 3:** Estudo da exatidão do método para amostras sintéticas

analito	Quantidade adicionada (mg L <sup>-1</sup> )	Quantidade encontrada (mg L <sup>-1</sup> )	%DPR	% Recuperação	Erro (%)
DMN	0,050	0,046	5,3	92,0	-8,0
NMOR	0,100	0,098	7,8	98,0	-2,0
NPIR	0,250	0,246	5,0	98,4	-1,6
DEN	0,300	0,293	4,0	97,7	-2,3
NPIP	0,200	0,206	9,0	97,0	+3,0

*DPR = desvio padrão relativo*

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY

Editor, Symposium Volumes: Erich Heftmann, Ph.D.

P.O. Box 928, Orinda, CA 94563, U.S.A.

October 8, 2002

Dr. Elina Bastos Caramão  
Instituto de Química  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Avenida Bento Gonçalves 9500  
CEP 91501-960, Bloco A  
Porto Alegre, RS  
BRAZIL

\*\*\*\*\*  
CHROMSYMP 5359

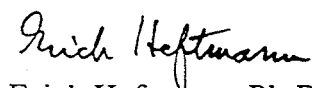
Determination of nitrosamines in preserved sa-  
sages by solid-phase extraction/ micellar electro-  
kinetic chromatography

\*\*\*\*\*

Dear Dr. Caramão:

I am pleased to inform you that your Ms. No.  
20512025 has been accepted for publication in the  
*Journal of Chromatography* under the above num-  
ber and title. Galley proofs will be sent to you in  
due course.

Sincerely yours,



Erich Heftmann, Ph.D.  
Editor, Symposium Volumes

P.S. Thank you for your cooperation in the peer  
review process.

PUBLISHERS: ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., P.O. BOX 332, 1000 AH AMSTERDAM, THE NETHERLANDS

**DETERMINATION OF NITROSAMINES IN PRESERVED SAUSAGES BY  
SOLID PHASE EXTRACTION - MICELLAR ELECTROKINETIC  
CHROMATOGRAPHY**

Pedro José Sanches Filho<sup>a</sup>, Angel Rios<sup>b</sup>, Miguel Valcárcel<sup>b</sup>, Kelen D. Zanin<sup>c</sup>  
and Elina Bastos Caramão<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup> Centro Federal de Educação Tecnológica – RS – Curso de Química, Praça  
Vinte de Setembro 455, CEP 96015-360, Pelotas, RS, Brazil

<sup>b</sup> Division of Analytical Chemistry, Campus de Rabanales, Edificio C3-anexo  
University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain, e-mail: [ga1ricaa@uco.es](mailto:ga1ricaa@uco.es)

<sup>c</sup> Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida  
Bento Gonçalves 9500, CEP 91501-960, Bloco A, Porto Alegre, RS, Brazil,  
e-mail: [elina@vortex.ufrgs.br](mailto:elina@vortex.ufrgs.br)

**DETERMINATION OF NITROSAMINES IN PRESERVED SAUSAGES BY  
SOLID PHASE EXTRACTION - MICELLAR ELECTROKINETIC  
CHROMATOGRAPHY**

Pedro José Sanches Filho<sup>a</sup>, Angel Rios<sup>b</sup>, Miguel Valcárcel<sup>b</sup>, Kelen D. Zanin<sup>c</sup>  
and Elina Bastos Caramao<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup> Centro Federal de Educação Tecnológica – RS – Curso de Química, Praça Vinte de Setembro 455, CEP 96015-360, Pelotas, RS, Brazil

<sup>b</sup> Division of Analytical Chemistry, Campus de Rabanales, Edificio C3-anexo University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain, e-mail: [qa1ricaa@uco.es](mailto:qa1ricaa@uco.es)

<sup>c</sup> Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, CEP 91501-960, Bloco A, Porto Alegre, RS, Brazil, e-mail: [elina@vortex.ufrgs.br](mailto:elina@vortex.ufrgs.br)

\* to whom correspondence should be addressed

**ABSTRACT**

A new methodology for extraction, pre-concentration and analysis of nitrosamines in meat derived products was developed. The samples (canned sausages) were distilled in vacuum steam and the nitrosamines were pre-concentrated by solid phase extraction (SPE) with active carbon. Then, micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was used for the separation and determination of the different nitrosamines contained in a real sample and gas chromatography with a mass spectrometry detector (GC/MSD) was used as

confirmation technique. The method allowed the determination of nitrosamine compounds at trace levels with relative standard deviation ranging from 4.0 to 22 %.

key words: nitrosamines, SPE, charcoal, MEKC

## INTRODUCTION

Nitrite and nitrate are normally added to meat smoked products as canned sausages, ham, salamis with the objective to prevent the formation of toxins from *Clostridium Botulinum*[1]. Nitrite is also responsible for the development of the flavor and steel react with some pigments of meat producing the desirable red color, characteristic of these products [1-2]. The undesirable reaction between nitrite and amine or amino derivatives, produces nitrosamines. These compounds are found in environment and in several foods [3-13], and have been receiving considerable attention as a function of their high toxicity [1]. Approximately 80 % of the nitrosamines that were tested in laboratory animals produced cancer. These compounds are amines with two organic groups (R) and one NO group bonded to a central nitrogen [1, 2]. The alkyl nitrosamines are carcinogenic and mutagenic, being activated by oxidation and subsequent generation of carbonium ions, which can promote the alkylation of the DNA [2,4]. It has been calculated that the tolerable level of human exhibition to the most volatile nitrosamines is in the range of 5 to 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  of human body. In some countries the laws can be more strict and these limits can be dislocated to minor values. For this reason a minimum detection limit less than of 10  $\mu\text{g L}^{-1}$



(considering the final extraction solution) is normally accepted as essential pre-requirement for the determination of this class of compounds, in foods and in environmental samples [2,8].

The analytical techniques that show sensibility at  $\mu\text{g L}^{-1}$  levels involve, usually, gas or liquid chromatography after the extraction from the original sample. These methods include, necessarily, long time procedures of clean up to remove any interference, mainly because most of the chromatographic detectors are not specific for the functional group NNO [1-3].

The Thermal Energy Analyzer detector (TEA), the only detector that is recognized as specific for nitrosamines, is based on the chemiluminescence generated by the decay of the  $\text{NO}_2$  group when it is electronically excited [1, 14]. This system is expensive and not available in most of the laboratories. This system demands the use of a spectroscopic technique for unequivocal detection of the chromatographic peaks [1]. The combination of gas chromatography and mass spectroscopy with ion monitoring, using different columns has been used to the identification and quantification of nitrosamines [1, 15].

Capillary Electrophoresis (CE) has emerged as an efficient and rapid separation technique in recent years and has been employed in many applications such as analysis of proteins, pharmaceuticals compounds cosmetics and environmental pollutants [2,16]. There is a sizeable quantity of CE methods to separate a wide variety of analytes. However for some class of compounds as nitrosamines, it is necessary more studies to carry out separation in commercial equipment [17]. This technique represents an alternative to the analysis of aqueous samples, which is not possible by gas chromatography.

For the separation of hydrophilic, low molecular weight, neutral and polar compounds, as nitrosamines, it is necessary to develop CE techniques enhancing their selectivity. The main reason is that these compounds do not interact strongly with commonly used surfactants (e.g. sodium dodecyl sulfate - SDS - or other buffers modifiers as cyclodextrins in electrokinetic chromatography) [16-19].

Ng and co-workers [17,18] developed the separation of nitrosamines by CE with  $\gamma$ -cyclodextrins (CD) and an open tubular column. Janin et al [17] investigated the separation of a select group of nitrosamines compounds by CE using sub-ambient column temperature to improve the resolution of these compounds and resulting in the separation of their *sym* and *anti* conformers.

The recovery of nitrosamines at ultra trace level may require the development of an adequate pre concentration method. Active carbon can be chosen for this pre concentration due its low cost, versatility and easy application [20,21].

The aim of this work was to develop a methodology for the extraction, pre concentration, separation and identification of nitrosamines in real samples using solid phase extraction with active carbon and capillary electrophoresis with fused silica capillary. The effects of buffer composition, instrumental variables, the optimization of conditions and characterization of the SPE with active carbon were investigated. The developed methodology is applicable to the determination of these analytes in different samples such as aqueous synthetic samples and sausages.

The confirmation of the presence of these compounds was made by GC/MSD. This technique is utilized to unequivocal identification of nitrosamines in different matrices and integrates the procedure of analysis of volatile

nitrosamines in nitrite-cured meat products utilized by USDA's Food Safety Inspection Service (FSIS), then the analytical technique give us the selectivity in the detection need to the determination of nitrosamines.

## EXPERIMENTAL

### Reagents

All the reagents used were, at least, of analytical grade. Sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sodium tetraborate ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ),  $\gamma$  cyclodextrin (CD), sodium dodecyl sulfate (SDS), were purchase from Fluka and Sigma respectively. The standards were purchased from Sigma Aldrich and were those recommended by the EPA 8270 method: dimethylnitrosamine (DMN), diethylnitrosamine (DEN), N-nitrosopyrrolidine (NPYR), N-nitrosomorpholine (NMOR), N-nitrosopiperidine (NPIP) plus biphenyl, that was used as internal standard (IS). These compounds were maintained at 4°C in the dark.

A 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  stock standard solution of each analyte was prepared in methanol and stored at 4°C. Spiked solutions were prepared daily by diluting the stock solution with bi-distilled water.

The adsorbent used was an active carbon, with 100 to 400 mesh and surface area of 860  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ , purchased from Merck. The pore size distribution revealed a uniform distribution with a mean pore volume of about 0.945  $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ . Active carbon was purified by Soxhlet extraction with dichloromethane, during 24 hours, and dried in an oven at 105 °C by 8 hours.

## Equipment

**CE:** Experiments were carried out in a Beckman PACE 5500 CE instrument. and a fused silica capillary was used for the separation of the analytes. The system comprised a 0 – 30 kV voltage built-in power supply, a diode array detector and a PACE software for system control data processing. The capillary (50 cm x 75  $\mu\text{m}$  i.d.) used was obtained from Beckman instruments (Fullerton, CA, USA). The temperature was maintained at 20 °C by using a fluorocarbon-based cooling fluid.

**GC/MSD:** A Gas Chromatography instrument with Mass Spectrometer Detector Shimadzu QP 5050A was used for confirmation purpose. A 30 m X 0.25 mm fused silica capillary column HP-1 (0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) was used for the GC separation with the following oven temperature program: 35 °C (3 min hold) heating to 70 °C at 5 °C  $\text{min}^{-1}$  and heating to 200 °C at 15 °C  $\text{min}^{-1}$  (10 min hold). The interface temperature and injector temperature were maintained at 200 °C. A volume of 1.0  $\mu\text{L}$  was injected in the split mode (1:20) and the detection was done mainly in the selected ion monitoring (SIM) mode (at  $m/z$  of 74, 100, 102, 114, 116, 154 u). In some application, mainly for confirmation of identity, the full scan spectra were also obtained .

## Sample preparation

The samples used in this work were canned sausages from Brazil (sample 1) and from Spain (sample 2), purchased from the local market.

The extraction was carried out by vacuum steam distillation, in a rotary vacuum evaporator (Eyela NE-1). 150 g of the sample was mixed with 100 mL of bi-distilled water and leaving in rest for 10 min. After this time the flask containing the mixture was connected to the rotary evaporator and the distillation took place. It was applied the maximum vacuum of a rotary oil pump and the water bath was heated to 65 °C. The condenser was cooling with water (4 °C) and the distilled was received in a flask of 500 mL in an ice bath. These conditions were maintained until no more distilled is produced, approximately 80 min. The distilled product was kept below 0 °C in the dark. This procedure was adapted from the method described by Telling et al.[15].

Active carbon in powder (100 to 400 mesh) was utilized to the pre concentration of the aqueous extracts. The variables affecting the SPE, such as adsorbent mass (0.5 – 1.0 g), adsorption time (15 – 45 min) and aqueous sample volume (25 – 200 mL ), were studied in different levels of concentration (0.05 – 0.8 mg L<sup>-1</sup>). The recovery studies were performed in aqueous synthetic sample, spiked real samples and unspiked real samples.

200 mL of each sample (aqueous distillate of solid sample) were magnetically stirred with 1.0 g of active carbon by 45 minutes. After this, the adsorbent was separated by filtration using a quantitative paper (Whatman, cat No. 1442125, ashless, model 42).

The liberation of the compounds from the adsorbent was done by elution with 10 mL of acetone, 10 mL of dichloromethane and an additional volume of 10 mL of this last solvent.

The fractions were concentrated under N<sub>2</sub> stream in an ice bath. The volumes were adjusted to 1 mL and received 2 mg L<sup>-1</sup> of biphenyl (as internal standard)

for the analysis by GC/MSD and adjusted to 5 mL with bi-distilled water for the analysis by capillary electrophoresis. All the analyzes were made at least in triplicate.

## **Analysis of samples**

Electrophoretic procedures – Prior to the first use, each new capillary was subjected to a wash cycle, according to the following procedure: 1 Mol L<sup>-1</sup> HCl solution was passed through the capillary (5 min), followed by NaOH 0.1 Mol L<sup>-1</sup> (10 min) and bi-distilled water (5 min). In order to maintain the capillary under good working condition, its surface was regenerated once a day by consecutive washing with water (5 min) followed by freshly prepared 0.1 Mol L<sup>-1</sup> NaOH (5 min), water (5 min) and fresh buffer (50 mMol L<sup>-1</sup> phosphate – borate and 80 mMol L<sup>-1</sup> of SDS) during 20 min. The MEKC separation was performed in a fused-silica capillary, at 20 °C. A voltage of 10 kV was used producing a mean current of 70 μA. Samples were injected by using the electrokinetic injection mode at 10 kV for 10 s. Electropherograms were recorded at 236 nm. Separations were carried out from the anode to the cathode. The pH was corrected to 6.6 with phosphoric acid 0.1 Mol L<sup>-1</sup>.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Pre-concentration**

The agitation time, mass and elution system were optimized to achieve the best efficiency of SPE with active carbon using synthetic sample. Table I shows the results in terms of recovery when the maximum values were used for each variable, such as 45 minutes of adsorption time, 1 g adsorbent, and 200 mL of sample volume to obtain the higher possible recovery.

Table I

The low recovery values (approximately 40 %) for the compounds NMOR, DMN and NPYR could be justified by the strong interaction with the aqueous matrix. These compounds show high polarity and can remain in the residual water after extraction. The study in the concentration at  $0.4 \text{ mg L}^{-1}$  allowed the detection of these compounds in the residual water. In the concentration of  $0.8 \text{ mg L}^{-1}$  all of the compounds were detected in the residual water, indicating the saturation of the solid phase.

Another source of losses in the procedure can occur during the change of the solvent and volume reduction. This step is critical because some residues of acetone tend to interfere in the detection of NMOR and DMN in the MEKC analysis.

The recovery values of the SPE procedure using solid spiked samples are low due to the difficulty in the extraction from the solid matrix in the vacuum steam distillate and also because of the concurrence among nitrosamines and other compounds in the samples.

### **Analysis of real sample**

## Performance of the Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (MEKC) method

SDS (40 to 80 mMol L<sup>-1</sup>) was used to improve the separation of the compounds due to the fact that it shows to have a key aspect for an efficient separation in MEKC. It acts as a pseudo-stationary phase of a chromatographic separation. The use of 80 mM L<sup>-1</sup> of SDS increased the capacity factor inducing a higher interaction of compounds with SDS and the resolution of the peaks was improved. For the development of this methodology it was used a standard mixture of 5 standard compounds (according Figure 1). The optimized variables and the best results that were obtained are showed in the Table II. Figure 2 shows the electropherogram after optimization of the variables. As it can be seen in Table II, the addition of  $\gamma$ -CD does not improve the separation and in the optimization method it did not added this substance.

Table II, Figure 1, Figure 2

In order to check the performance of electrophoretic method, a calibration curve was constructed without any pre-concentration of the sample in a concentration range from 0.50 to 10.00 mg L<sup>-1</sup>. Each point of the calibration curve corresponds to the mean value obtained from, at least, three independent area measurements. The limit of detection (LOD) was calculated by using 3-times the standard deviation of the intercept divided by the slope, whereas limit of quantification (LOQ) was calculated by using 10-times its standard deviation of the intercept divided by slope. The corresponding regression equation and other characteristics parameters for the determination of the nitrosamines compounds are shown in Table III. Eleven replicate analysis were performed on synthetic



sample at  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  in order to evaluate the precision of the method to each compound. The results are also summarized in Table III. The LOD value was between  $160$  and  $240 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  and LOQ value was between  $520$  and  $820 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Furthermore a calibration curve was carried out including the pre concentration step in active carbon, with concentrations varying from  $50$  to  $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . In this case the calculated LOD was between  $34 - 60 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  to  $100 \text{ mL}$  of sample and  $22 - 35 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  to  $200 \text{ mL}$  of sample for all nitrosamines studied. The results are summarized in Table IV. The use of the pre-concentration procedure improved sensibility and detection limit.

Table III, Table IV

### **GC/MSD**

This technique was applied to Brazilian sausages sample to confirm the presence of the nitrosamines detected by MEKC.

It was constructed a calibration curve without any pre-concentration of the sample in the range of  $0.5$  to  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , according Table V. The LOD value was among  $214 - 846 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  and LOQ was between  $900 - 2821 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . These high values of LOD and LOQ proved that the technique also needs the pre-concentration process and presents smaller sensibility than MEKC, thus the analysis of GC/MSD of the samples, only to confirmation purposes, were made using pre concentration step.

Table V

### **Analytical applications**

To demonstrate the applicability of the proposed method, it was used spiked and unspiked real samples for the determination of nitrosamines. The recoveries obtained for the nitrosamines in different samples and the respective extraction procedure are summarized in Table I. The methodology allowed the extraction, pre-concentration and separation of the nitrosamines.

The study with synthetic aqueous samples was carried out by SPE/MEKC using three aqueous samples in distilled water. It was varied the concentration and the group of standards. The recoveries obtained for nitrosamines, in the range of 68.8 to 105.0%, are summarized in the Table VI.

Table VI

Figure 3 shows the electropherogram of the eluates of acetone from solid sample (A) unspiked and (B) spiked (with the addition of the standards solution). In this Figure it is possible to note the increasing in the area of some marked peaks, indicating the presence of these compounds in the original sample.

Figure 3

Figure 4 shows the electropherogram of the eluate of acetone from solid sample (B) previously spiked (with the addition of the standard solution in the concentration of 1 ppm before the extraction), (C) posterior spiked (with the addition of the standards after the extraction) and (A) the standard solution at 10 mg L<sup>-1</sup>, for comparing purposes. The study of the Figures shows the capacity of the steam vacuum distillation to extracted these compounds from real samples and to separate them by MEKC. The results suggest the presence of NPIP, NPYR, NMOR and DEN in the samples studied.

Figure 4

Figure 5 shows the Single Ion Monitoring Chromatogram of the acetone eluate obtained by SPE after the vacuum steam distillation of the sample of sausages. This Figure allows, through the study of retention time and mass spectra, to confirm the presence of the compounds NPIP, NMOR, NPYR.

Figure 5

The simple fact of the identification of these compounds by the methodology proposed here is very important because it indicates high concentration values in foodstuffs, representing a risk to the human exposition.

## **CONCLUSIONS**

The optimization of a methodology using SPE with active carbon and vacuum steam distillation to separate nitrosamines from sausages samples and aqueous samples was achieved. The developed technique is simple and highly suitable for extraction, pre-concentration, separation and determination of nitrosamines at low levels in the foodstuffs.

The combination of this extraction procedure with MEKC and GC/MSD shows to be very suitable for the study of nitrosamine in the proposed samples. The method shows a short analysis time, high efficiency, suitable sensitivity and it is simple to use.

## **ACKNOWLEDGMENT**

Financial support provided by DGICyT (Project nº PB95-0977) is gratefully acknowledged. One of the authors (P. J. S.) thank to University of Cordoba

Department of Analytical Chemistry and Ecology, Group of the Investigation in Viticulture y Enology of Sciences Faculty and CAPES(Brazil) by scholarship.

## REFERENCES

1. K. Ikeda, K.G. Migliorese, *J. Soc. Chem.* 41 (1990) 283.
2. S. Charpentier, *The Ecologist* April (2001) 54
3. J. You, X. Fan, W.O.Q. Lao, *Talanta* 48 (1999) 437.
4. M. T. Matyska, J. J. Pesek, L. Yang, *J. Chromatogr. A*, 887 (2000) 497.
5. C.P. Oliveira, M.B.A. Glória, J.F. Barbuor, R.A. Scalan, *J. Agric. Food Chem.* 43(4) (1995) 967.
6. E.J. Mitacek, K.D Brunnemann, M. Suttajit, N. Martin, T. Limasila, H. Oshima, L.S. Caplan, *Food Chem Toxicol.* 37, (1999) 297.
7. L. Cárdenes, J.H. Ayala, V. González, A. M. Afonso, *J. Chromatogr. A* 946 (2002) 133.
8. B.A. Tomkins, W.H. Griest, *Anal. Chem.* 68(15) (1996) 2533.
9. S. Song, D.L. Ashley, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1303.
10. N.P. Sen, W.S. Stephen, B.D. Page, *J. Chromatogr. A.* 788 (1997) 131.
11. M.B.A. Glória, J. F. Barbour, R.A. Scalan, *J. Agric Food Chem.* 45 (1997) 814.
12. P. Lavallois, P. Ayotte, J.M.S. Van Maanen, T. Desrosiers, S. Gingras, J.W. Dallinga, I.T.M. Vermeer, J. Zee, G. Pirier, *Food Chem Toxicol.* 38 (2000) 1013.
13. E. Proksch, *Int. J. Hugiene and Environ. Health* 204 (2001) 103.
14. C. Fu, H. Xu, *Analyst* 120 (1995) 1147.

15. G.M. Telling; T.A. Bryce, J. Althorpe; J. Agric Food Chem. 19 (1971) 937.
16. K.D. Altria, J. Chromatogr. A. 856 (1999) 443.
17. K. Kitagishi, in H. Shintani, J. Polonsk (Editors), Handbook of Capillary Electrophoresis Applications, Blackie Academic & Professional, London ,1997, p.17.
18. C.I. Ng, C.P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, J. Chromatogr. Sci. 32 (1994) 121.
19. E. Dabek - Zlotorzynska, Electrophoresis 18 (1997) 2453.
20. R.J. Martin, R.C. Shackleton, Water Res. 24 (1990) 477.
21. G. Borghesani, C. Locatelli, Ann. Chim. (Rome) 73 (1983) 137.

## FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Structure of the nitrosamines analyzed in this work

Figure 2. Electropherogram of a nitrosamine standard mixture (2 mg L<sup>-1</sup>)

*Analytical conditions: Buffer: 50 mMol L<sup>-1</sup> phosphate/borate, pH 6.6, 80 mMol L<sup>-1</sup> SDS, Injection electrokinetic, 10 kV -10s, voltage applied 10kV.*

Figure 3. Electropherogram of acetone eluates of the nitrosamine extracted from 150 g of the sausages unspiked (A) and spiked (B)

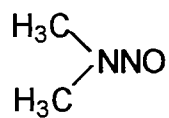
*Analytical conditions: Buffer: 50 mMol L<sup>-1</sup> phosphate/borate, pH 6.6, 80 mMol L<sup>-1</sup> SDS, Injection electrokinetic, 10 kV -10s, voltage applied 10kV.*

Figure 4. Electropherogram of (A) a nitrosamine standard solution at 10 mg L<sup>-1</sup>, (B) the acetone eluates of the extracted nitrosamine from sausages previously spiked, (C) the acetone eluates of the extracted nitrosamine from sausages posterior spiked

*Analytical conditions: Buffer: 50 mMol L<sup>-1</sup> phosphate/borate, pH 6.6, 80 mMol L<sup>-1</sup> SDS, Injection electrokinetic, 10 kV -10s, voltage applied 10kV.*

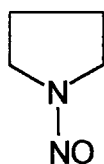
Figure 5. Single Ion Monitoring Chromatogram of the acetone eluate from the sausages

*Chromatographic conditions: Column HP-1 (30 m X 0.25 mm X 0.25 μm), temperature program: 35 °C (3 min hold) heating to 70 °C at 5 °C min<sup>-1</sup> and heating to 200 °C at 15 °C min<sup>-1</sup> (10 min hold), interface temperature and injector temperature at 200 °C, split 1:20.*



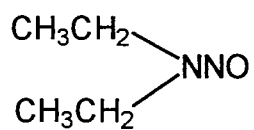
Dimethylnitrosamine

DMN



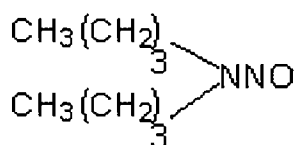
N-Nitrosopyrrolidine

NPYR



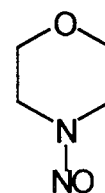
Diethylnitrosamine

DEN



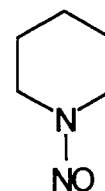
N-Nitrosodibutylamine

DBN



N-Nitrosomorpholine

NMOR



N-Nitrosopiperidine

NPIP

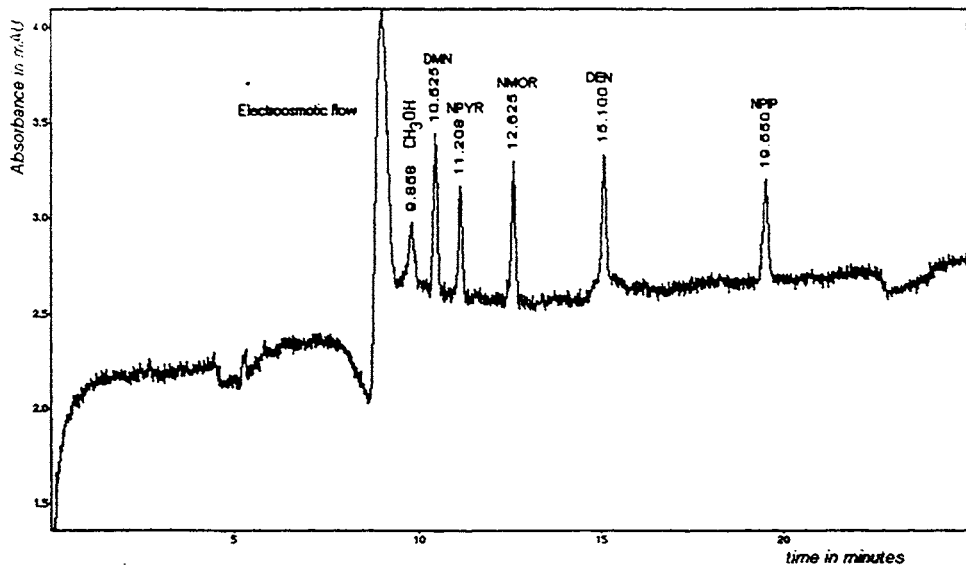


Figure 2



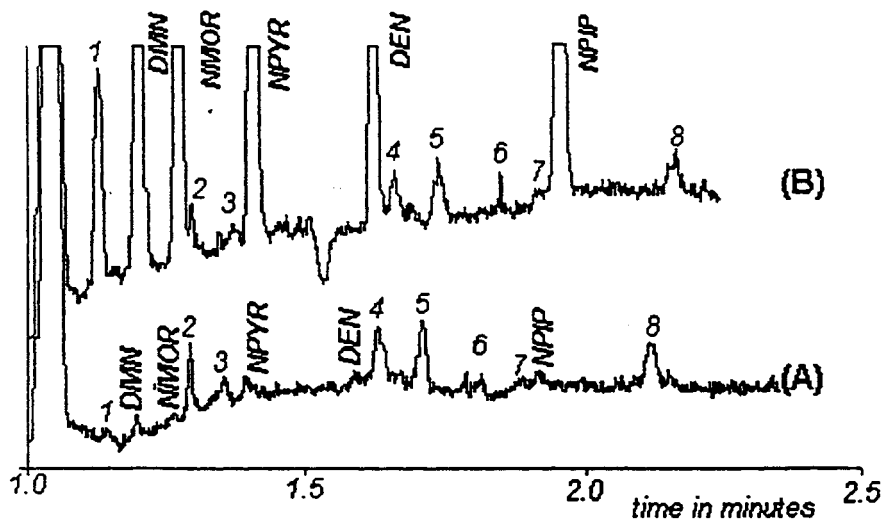


Figure 3

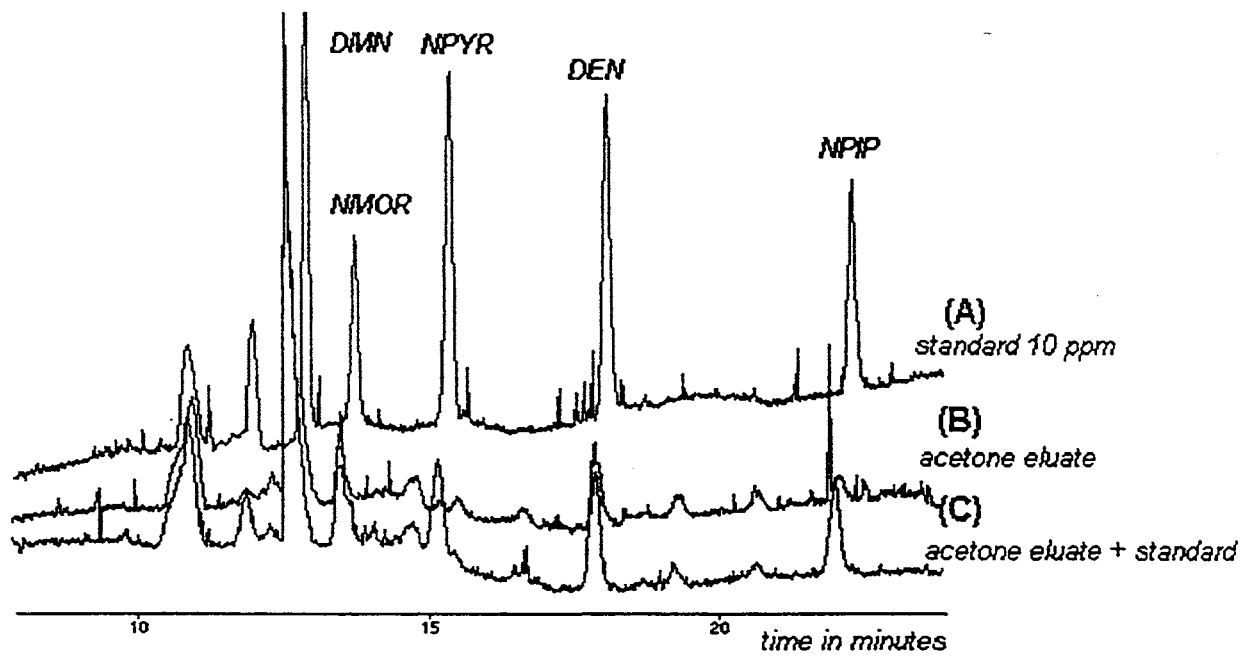


Figure 4

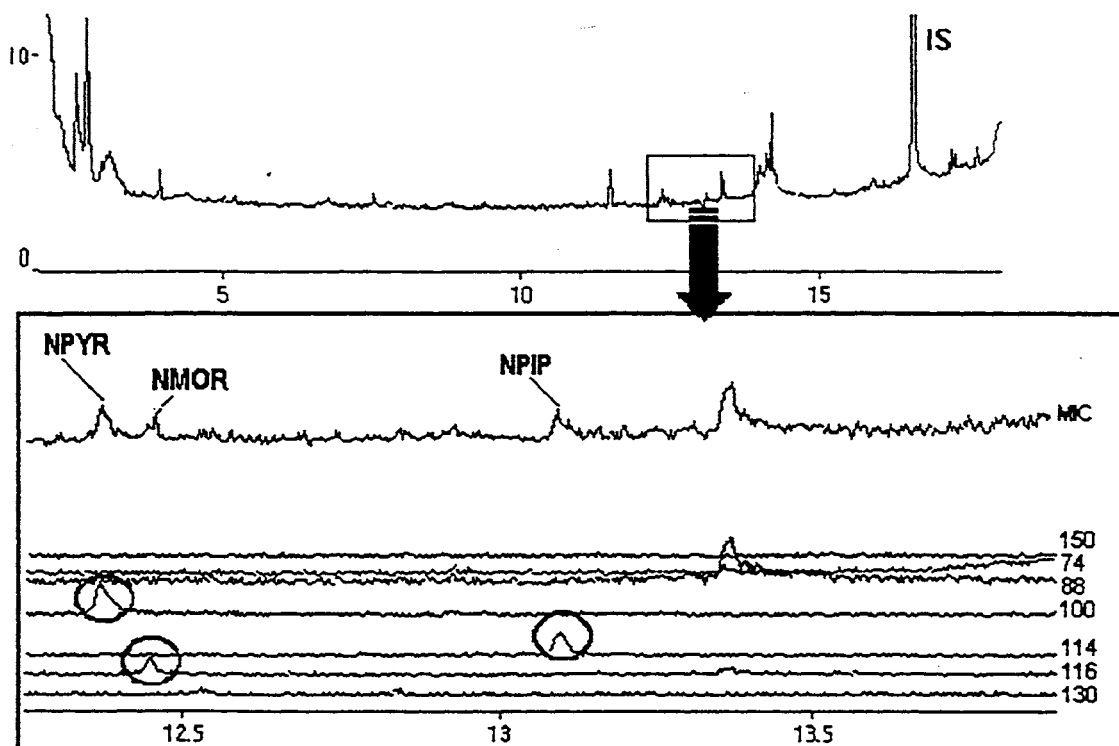


Figure 5

**Table I.** Recovery of the nitrosamines for different samples

compounds	<i>Synthetic sample</i>		<i>Synthetic sample</i>		<i>Synthetic sample</i>		<i>Vacuum steam distillation</i>	
	25 mL 0.8 mg L <sup>-1</sup>	RSD %	25 mL 0.4 mg L <sup>-1</sup>	RSD %	200 mL 0.05 mg L <sup>-1</sup>	RSD %	Solid sample 1.0 mg kg <sup>-1</sup> *	RSD %
DMN	61.5	6.9	44.7	7.9	68.3	5.2	----	
NMOR	44.2	6.9	39.0	10.9	37.6	13.8	42.3	13.8
NPYR	67.7	11.9	37.0	11.5	38.1	13.9	38.2	15.9
DEN	86.9	10.2	78.0	12.7	91.5	12.3	55.0	9.0
NPIP	102.9	7.9	74.8	12.2	86.6	5.3	45.9	7.5

*RSD = relative standard deviation*

*\* amount of analites added at the solid sample (spike procedure)*

**Table II.** Optimized Variables and the best results for the development of MEKC method using spiked solution

variable	studied	optimized
SDS	40-80 mM	80 mM
$\gamma$ CD	0-20 mM	without $\gamma$ CD
pH	4.0 - 6.6	6.6
Injection mode	Hydrodynamic electrokinetic	electrokinetic
Injection time	5 - 30 s	10 s
Injection voltage	5 - 20 kV	10 kV
Separation voltage	5 - 10 kV	10 kV

**Table III.** Figures of merit of the electrophoretic method without pre concentration of samples

<i>analytes</i>	Equation	r	R <sup>2</sup>	S y/x	LOD	LOQ	RSD %
DMN	a=-865.1±236.3 b=4149.5±76.44	0.993	99.4	672.6	170	570	4.5
NMOR	a=-213.9±217.3 b=2661.0±45.8	0.995	99.6	695.6	240	820	5.0
NPYR	a=315.7±231.1 b=3462.1±48.8	0.995	99.6	739.7	200	670	4.7
DEN	a=195.3±149.4 b=2871.0±31.51	0.994	99.8	478.1	160	520	5.4
NPIP	a=-684.9±237.4 b=3332.2±50.1	0.997	99.6	759.9	210	710	6.9

(\*) a: Intercept; b: slope; S x/y: standard deviation of residual; r: correlation coefficient; R<sup>2</sup>: curve fitting level (in %) obtained by analysis of variance (ANOVA) for the validation of the model; LOD: limit of detection; LOQ limit of quantification (LOD and LOQ are expressed in µg L<sup>-1</sup>); RSD = relative standard deviation

**Table IV.** Figure of merit of electrophoretic method with pre concentration active carbon Powder using 200.0 mL of aqueous sample

<i>analytes</i>	Equation	r	R <sup>2</sup>	S y/x	LOD	LOQ	RSD %
DMN	a=1091.0±161.1 b=17.36±0.309	0.998	99.6	412.8	27.8	92.6	4.0
NMOR	a=342.0±124.4 b=10.4±0.239	0.996	99.6	18.76	36.0	120.0	16.6
NPYR	a=568.5±148.6 b=19.8±0.290	0.998	99.7	389.9	22.5	75.1	17.4
DEN	a=-1761.7±233.7 b=26.75±0.445	0.998	99.6	598	26.1	87.3	22.7
NPIP	a=-865.8±222.4 b=28.25±0.428	0.998	99.7	570.0	23.6	78.74	20.7

(\*) a: Intercept; b: slope; S x/y: standard deviation of residual; r: correlation coefficient; R<sup>2</sup>: curve fitting level (in %) obtained by analysis of variance (ANOVA) for the validation of the model; LOD: limit of detection; LOQ limit of quantification (LOD and LOQ are expressed in µg L<sup>-1</sup>); RSD = relative standard deviation

Table V. Figure of merit GC/MSD method without pre concentration

<i>analytes</i>	Equation	r	R <sup>2</sup>	S y/x	LOD	LOQ	RSD %
DMN	a=-0.021±0.021 b=0.098±4.8.10 <sup>-3</sup>	0.994	98.8	0.054	214	900	1.9
NMOR	a=-0.03±0.015 b=0.09±3.0.10 <sup>-3</sup>	0.993	98.95	0.040	500	1667	1.0
NPYR	a=-0.19±0.079 b=0.28±1.5 . 10 <sup>-3</sup>	0.981	99.0	0.204	846	2821	2.6
DEN	a=-0.034±0.035 b=0.19±6.8.10 <sup>-3</sup>	0.993	98.9	0.090	552	1842	2.5
NPIP	a=-0.17±0.04 b=0.21±7.8.10 <sup>-3</sup>	0.992	98.3	0.103	571	1900	2.9

(\*) a: Intercept; b: slope; S x/y: standard deviation of residual; r: correlation coefficient; R<sup>2</sup>: curve fitting level (in %) obtained by analysis of variance (ANOVA) for the validation of the model; LOD: limit of detection; LOQ limit of quantification (LOD and LOQ are expressed in µg L<sup>-1</sup>); RSD = relative standard deviation



**Table VI** Analysis of aqueous synthetic samples by SPE/MEKC (concentration in mg L<sup>-1</sup>)

Sample	analyte	Amount added	Amount found	Error(%)	Recovery(%)
1	DMN	0.300	0.237	21	79.0
	NMOR	0.050	0.044	12	88.0
	NPYR	0.300	0.277 <sup>1</sup>	7.7	92.3
	DEN	1.000	0.988	1.2	98.8
	NPIP	0.800	0.734	9.0	91.0
2	NMOR	0.700	0.617	11.9	88.1
	NPYR	0.900	0.882	3.0	97.0
	DEN	0.200	0.168	6.0	84.0
	NPIP	0.400	0.333	6.8	83.2
3	DMN	0.300	0.200	31.4	68.6
	NMOR	0.500	0.343	31.4	68.6
	NPYR	0.800	0.570	28.8	71.2
	DEN	0.600	0.633	5.0	105
	NPIP	0.300	0.252	16.0	84.0