

Área: Ciência de Alimentos

DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO EM ALIMENTOS INFANTIS UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR

**Fabiana Della Betta*, Fabíola Carina Biluca, Priscila Missio da Silva, Isis Olivo,
Luciano Vitali, Ana Carolina de Oliveira Costa**

*Laboratório de Química de Alimentos, Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.*

**E-mail: fabianadb@gmail.br*

RESUMO – O nitrato está presente naturalmente em muitos vegetais empregados em formulações de alimentos infantis, esse pode ser reduzido a nitrito, composto que pode levar ao desenvolvimento de metemoglobinemia, doença cujo principal grupo de risco são crianças menores que 6 meses de idade. A fim de verificar se as amostras de alimentos infantis comercializadas estão de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira, determinaram-se os teores de nitrato e nitrito em sete amostras, adquiridas em comércio local, empregando a técnica de eletroforese capilar. O método empregado permitiu a separação dos analitos em tempo menor que 1 minuto, permite a determinação simultânea de ambos os analitos. As amostras apresentaram concentração de nitrato entre 8,84 a 244,41 mg kg⁻¹, valores de acordo com o valor exigido pela ANVISA e em nenhuma amostra foi detectada a presença de nitrito.

Palavras-chave: eletroforese capilar, nitrato, nitrito, alimentos infantis.

1 INTRODUÇÃO

Durante a infância o aleitamento materno é a principal fonte de nutrientes. Entretanto a partir dos 4 meses de vida pode-se empregar os chamados alimentos de transição como uma forma de substituir gradualmente a amamentação (PANDELOVA et al. 2012). A Portaria n ° 34, de 13 de janeiro de 1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define os alimentos de transição como os alimentos industrializados para uso direto ou empregados em preparados caseiros, utilizados como complemento do leite materno ou de leites modificados introduzidos na alimentação de lactentes e crianças de primeira infância. E que objetivam promover uma adaptação progressiva aos alimentos comuns, e de tornar essa alimentação balanceada e adequada às suas necessidades, respeitando-se sua maturidade fisiológica e seu desenvolvimento neuropsicomotor (BRASIL, 1998). Dentre os ingredientes permitidos para este tipo de formulação estão: leite e derivados; carnes e peixes; óleos e gorduras vegetais; frutas; hortaliças; leguminosas e tubérculos.

Os vegetais apresentam-se como uma importante fonte de nutrientes à dieta, mas também são uma fonte natural de nitrato (CHAN, 2011). O nitrito também pode estar presente na natureza, porém em menor concentração, uma vez que resulta da redução do nitrato pela ação de bactérias nitrato redutoras (GREER ; SHANNON, 2005).

O nitrato por si só não é tóxico e pode ser excretado na urina sem causar efeitos adversos, mas sob condições de pH baixo e ação de bactérias nitrato redutoras pode ser reduzido a nitrito, e este levar ao desenvolvimento de metemoglobinemia, síndrome causada pelo aumento da concentração de metemoglobina no sangue, devido a oxidação da hemoglobina a metemoglobina, composto incapaz de transportar o oxigênio no sangue. Esta doença é particularmente perigosa para crianças menores de 6 meses, podendo ser fatal principalmente em crianças recém-nascidas, pois estas não possuem o sistema imunológico completamente desenvolvido e por isso não produzem a enzima metemoglobina redutase em quantidade suficiente para converter a metemoglobina novamente a hemoglobina (CAMMACK et al., 1999; CHAN, 2011; MCMULLEN et al. 2005). A literatura reporta casos de metemoglobinemia associados ao consumo de vegetais por crianças menores de 2 anos (SANCHEZ-ECHANIZ; BENITO-FERNÁNDEZ; MINTEGUI-RASO, 2001; GREER ; SHANNON, 2005). Martinez e colaboradores (2013) observaram 78 casos de metemoglobinemia em Pamplona na Espanha entre os anos de 1987 a 2010, associados à ingestão de preparações caseiras de alimentos infantis mantidas sob refrigeração e consumidas após 24 horas.

A legislação brasileira estipula que o conteúdo de nitrato em formulações infantis prontas para o consumo não devem exceder 250 mg kg^{-1} . Esta legislação também indica que produtos que contêm espinafre e beterraba devem apresentar no rótulo a advertência em destaque e em negrito "Contém espinafre e/ou beterraba. Não pode ser consumido por menores de 3 meses de idade".

O método oficial da AOAC para determinação de nitrato é baseado na redução do nitrato a nitrito em uma coluna de cádmio, seguida da determinação espectrofotométrica do nitrito. Este método demanda longos de tempos de análise, especialmente na etapa de preparo de amostra, usa elevado volume de reagentes, o que gera elevado volume de reagente. Devido a estas desvantagens, vem aumentando o interesse por técnicas alternativas ao método oficial, como a eletroforese capilar (EC). A EC é uma técnica versátil capaz de analisar cátions, ânions e compostos neutros, suas principais vantagens são separações rápidas, alta resolução, pequenos volumes de injeção (nL) e baixo volume de reagentes e resíduos (RIZELIO et al., 2012).

Apesar de o aleitamento materno ser recomendado como melhor fonte de nutrientes para crianças menores de 6 meses idade, cada vez mais as mães tem optado por alimentar seus filhos com formulações infantis industrializadas, por isso é importante que haja efetivo controle de qualidade na composição e um controle rigoroso dos teores de nitrato nessas formulações de modo a não representar um risco a saúde. O objetivo deste trabalho foi determinar nitrato e nitrito em formulações de alimentos infantis usando um método rápido por eletroforese capilar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Todas as soluções foram preparadas empregando reagentes de grau analítico e água desionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, E.U.A.). Os padrões nitrato e nitrito de sódio e tiocianato de potássio foram adquiridos da MERCK (Darmstadt, Alemanha).

2.2 Preparo de amostra

Foram adquiridas sete amostras de alimentos infantis de diferentes marcas no comércio local de Florianópolis – SC e até o momento das análises as mesmas foram mantidas sob refrigeração. As amostras analisadas eram compostas principalmente por batata, espinafre, abóbora, cenoura e beterraba.

O preparo de amostra foi feito de acordo com McMullen et al. (2005) com modificações. Em um tubo de centrífuga pesou-se uma alíquota de 10 gramas de amostra, foi adicionado 10 mL de água desionizada (60°C) e a solução resultante foi submetida à agitação mecânica por 1 minuto. Após o resfriamento a amostra foi transferida para um balão volumétrico, adicionada de 1 mL de acetonitrila e o volume ajustado para 25 mL. Após homogeneização a solução foi centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm e uma fração do sobrenadante foi coletada, diluída com padrão interno e em seguida injetada no equipamento de eletroforese capilar.

2.3 Instrumental

As determinações foram conduzidas em um equipamento de eletroforese capilar (Agilent Technologies, modelo 7100, Palo Alto, CA, E.U.A.) equipado com detector de arranjo de diodos. As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida de 32 cm (8,5 cm comprimento efetivo \times 50 μ m D. I. \times 375 μ m O.D.), modo de detecção direto a 210 nm, injeção hidrodinâmica pela extremidade mais curta do capilar (50 mbar/ 3 s), tensão de 30 KV. O eletrólito de corrida foi constituído por ácido perclórico 30 mmol L⁻¹ e β -alanina 50 mmol L⁻¹. Tiocianato foi usado como padrão interno na concentração de 50 mg L⁻¹ em todas as injeções.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

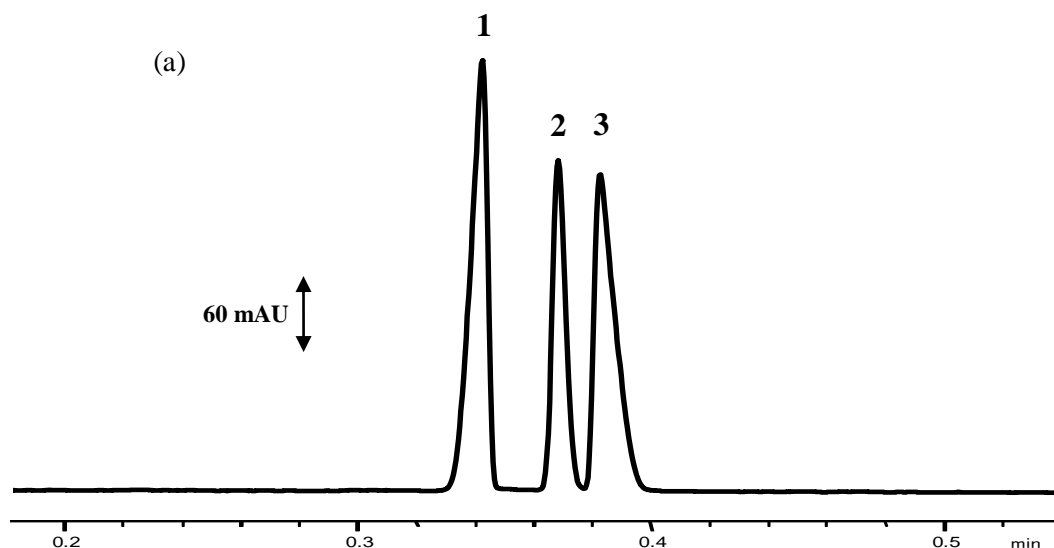
As concentrações de nitrato nas amostras analisadas variaram de 8,84 a 244,41 mg kg⁻¹, sendo que a menor concentração de nitrato foi encontrada na amostra cujo componente majoritário era banana, enquanto que a maior concentração foi detectada na papinha orgânica sabor abóbora, as amostras contendo espinafre e beterraba também apresentaram concentrações elevadas, resultado esperado pelo fato destes vegetais apresentarem elevadas concentrações de nitrato. Todas as amostras de alimentos infantis analisadas apresentaram concentrações de nitrato de acordo com o limite estabelecido pela ANVISA (menor que 250 mg kg⁻¹) e em nenhuma das amostras foi detectada a presença de nitrito, dados apresentados na Tabela 1.

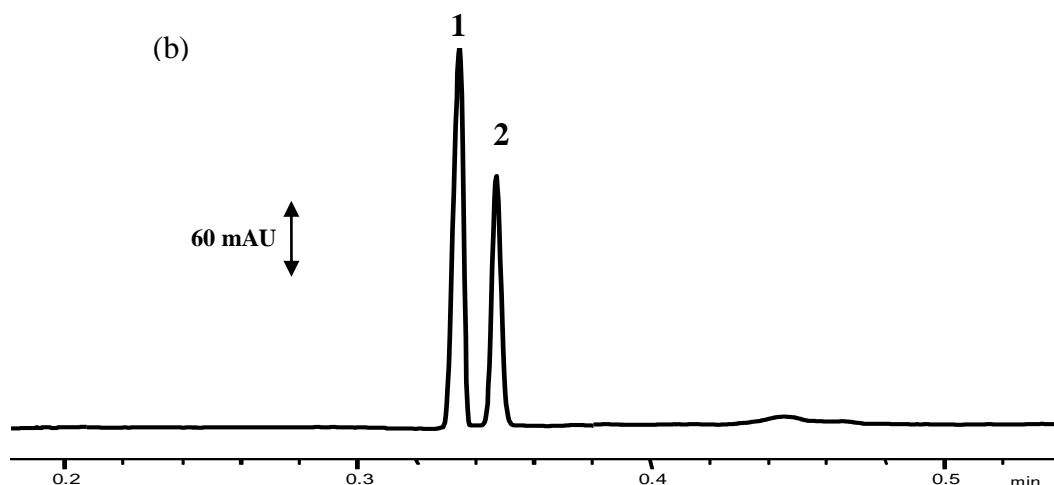
Tabela 1. Quantificação de nitrato e nitrito em amostras de alimentos infantis utilizando eletroforese capilar.

Amostra	Nitrato (mg kg^{-1})	Nitrito (mg kg^{-1})
Alimento à base de banana	$8,84 \pm 4,41$	< LOQ
Alimento à base de legumes e carne	$63,88 \pm 1,39$	< LOQ
Alimento à base de beterraba	$200,60 \pm 8,71$	< LOQ
Alimento à base de espinafre	$157,58 \pm 4,37$	< LOQ
Alimento à base de legumes	$135,58 \pm 2,58$	< LOQ
Alimento orgânico à base de abóbora	$244,41 \pm 4,46$	< LOQ
Alimento orgânico à base de vegetais	$199,19 \pm 3,20$	< LOQ

O método empregado apresenta vantagens em relação ao método oficial, pois permite a determinação dos analitos em tempo inferior a 1 minuto, gera menos resíduo, além de permitir a detecção simultânea de nitrato e nitrito, enquanto que o método oficial é monoelementar, demanda longos tempos de análise (> 3 horas) e utiliza grandes volumes de reagentes. A Figura 1 apresenta o eletroferograma dos padrões de nitrato e nitrito e a quantificação de nitrato e nitrito em uma amostra de alimento infantil, na qual não foi detectada a presença de nitrito.

Figura 1. Eletroferograma da separação dos analitos em (a) solução padrão e (b) amostra alimentos infantis. Onde: (1) nitrato; (2) tiocianato (padrão interno), (3) nitrito.





Mesmo as amostras não apresentando concentrações de nitrato superiores ao limite da legislação, recomenda-se que sejam seguidas as instruções do fabricante quanto ao acondicionamento e consumo do produto (após aberto, o produto deve ser consumido em até 24 horas), caso contrário pode-se gerar condições favoráveis à conversão de nitrato a nitrito pela ação de bactérias nitrato-redutoras e expor o consumidor ao risco de intoxicação por nitrito.

4 CONCLUSÃO

Todas as sete amostras de alimentos infantis analisadas atenderam as exigências da legislação brasileira quanto ao teor de nitrato, e não foi detectada a presença de nitrito em nenhuma das amostras analisadas. No entanto, devido a elevada concentração de nitrato presente em algumas amostras recomenda-se seguir as indicações do fabricante quanto a forma de consumo, acondicionamento e faixa etária indicada para cada tipo de formulação.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPQ e a UFSC pelo apoio financeiro.

6 REFERÊNCIAS

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n ° 34, de 13 de janeiro de 1998. **Regulamento técnico referente a alimentos de transição para lactentes e crianças de primeira infância**. Brasília, 1998.
- CAMMACK, R. et al. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, p. 475-488, 1999.

- CHAN, T. Y. K. Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinaemia. **Toxicology Letters**, v. 200, p. 107–108, 2011.
- GREER, F. R.; SHANNON, M. Infant Methemoglobinemia: The Role of Dietary Nitrate in Food and Water. **Pediatrics**, v. 116, n. 3, 784-786, 2005.
- MARTINEZ, A.; SANCHEZ-VALVERDE, F.; GIL, F.; CLERIGUÉ, N.; AZNAL, E.; ETAYO, V.; VITORIA, I.; OSCOZ, M. Methemoglobinemia induced by vegetable intake in infants in northern Spain. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 56, n. 6., 2013.
- MCMULLEN, S. E.; CASANOVA, J. A.; GROSS, L. K.; SCHENCKS, F. J. Ion Chromatographic Determination of Nitrate and Nitrite in Vegetable and Fruit Baby Foods. **Journal of AOAC international**, v. 88, n. 6, p. 1793-1796, 2005.
- PANDELOVA, M.; LOPEZ, W. L.; MICHALKE, B.; SCHRAMM, K-W. Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, and Zn contents in baby foods from the EU market: Comparison of assessed infant intakes with the present safety limits for minerals and trace elements. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, p. 120–127, 2012.
- RIZELIO, V. M.; TENFEN, L.; DA SILVEIRA, R.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. FETT, R. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples. **Talanta**, V. 93, P. 62-66, 2012.
- SANCHEZ-ECHANIZ, J.; BENITO-FERNÁNDEZ, J.; MINTEGUI-RASO, S. Methemoglobinemia and Consumption of Vegetables in Infants. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, p. 1024 -1028, 2001.