

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITRATO EM FÓRMULA INFANTIL POR  
SISTEMA FIA E ESTIMATIVA DA SUA EXPOSIÇÃO PELOS LACTENTES

PARECER

Este exemplar corresponde  
à redação final da tese defendida  
por **Elede Martins Elias**, aprovada  
pela Comissão Julgadora em  
fevereiro de 2005.

Elede Martins Elias  
Farmacêutica bioquímica

Campinas, 25 de fevereiro de

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes  
Presidente da Banca

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes  
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, para a  
obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas – SP  
2005

IDADE	75
CHAMADA	UNICAMP
EX	EL42d
MBO BC/	62980
DC.	12.0002.05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
IEÇO	1.00
ATA	13/04/05
CPD	

libid 347415

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

EL42d	<p>Elias, Elede Martins</p> <p>Determinação do teor de nitrato em fórmula infantil por sistema FIA e estimativa da sua exposição pelos lactentes / Elede Martins Elias. – Campinas, SP : [s.n.], 2005.</p> <p>Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.</p> <p>1. Nitrato. 2. Nitritos. 3. Metemoglobinemia. 4. Análise por injeção de fluxo. I. Reyes Reyes, Felix Guillermo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.</p>
-------	--

Palavras-chave em inglês (Keywords): Nitrate, Nitrite, Methemoglobinemia,  
Flow injection analysis

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Felix Guillermo Reyes Reyes

Marcelo Alexandre Prado

Silvia de Oliveira Santos Cazenave

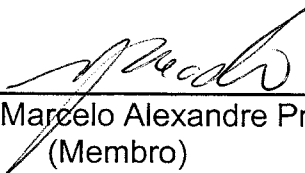
Elizatebeth de Souza Nascimento

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes  
(Orientador)



---

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado  
(Membro)



---

Profª. Drª Silvia De Oliveira Santos Cazenave  
(Membro)

---

Profª Drª Elizabeth De Souza Nascimento  
(Membro)

**Ao José,  
Meus filhos,  
Minha família.**

## AGRADECIMENTOS

- À deus, pelo Dom da Vida.
- Ao José, meu amor, pela compreensão e incentivo. Aos meus filhos, Rodrigo e aquele que está por vir, pela esperança.
- Aos meus pais, Wellington e Maria Thereza, pelo esforço de todos os meus anos de estudo e o carinho em todos os momentos de minha vida. Deixo expresso a minha gratidão.
- Aos meus sogros, Luquim e Olga, pelo apoio e valiosa colaboração. Não há palavras que agradeça por toda atenção e dedicação.
- As minhas irmãs, Elen e Evelin, pela constante presença em minha vida.
- À toda minha família, Martins e Elias, pelo carinho, apoio, participação.
- Ao professor Felix Guillermo Reyes Reyes pelo privilégio deste aprendizado, pela sua nobre orientação, disponibilidade, amizade, confiança e, principalmente pelo carinho em meus momentos de mestranda.
- À professora Suzanne Rath, pela excelente orientação, carinho, convivência e sincera amizade. Agradeço imensamente por ser a minha co-orientadora de coração.
- À minha grande e primeira amiga de toxicologia, Silvane, por ser fundamental em meu aprendizado, pela dedicação e pela carinhosa amizade. Sinto saudades.
- Aos meus adorados amigos de toxicologia, Camila, Gustavo, Samanta e Mônica Alessandra, por nossa agradável convivência, troca de experiências, por toda ajuda, apoio e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho. A minha amiga Camila, em especial, por toda sua boa vontade, disposição e bom tempo comigo.
- Aos meus amigos de laboratório de toxicologia da Ciência de Alimentos, Luis, Mônica, Silvia Amélia, Rita, Silvia Helena, Carla, Zezé, professoras Maria Cecília e Silvia, por toda atenção, apoio, ajuda, amizade e adorável convivência.

- Aos amigos do IQ, Regiane Gregório, Regiane Favaron, Cláudia, Paula, Gabriella, Socorro, Mônica, Eduardo, Jamil, Jonas, Guida e Vera, pela amizade e apoio.
- Aos amigos do laboratório de microbiologia, Luciana, Ísis, Fábio, Cristiano, Éder, pela amizade e harmoniosa vizinhança.
- Aos meus amigos do laboratório de análises de alimentos, Elizete, Roger, Cláudia, Regina, Juliana, Rodrigo, pela alegria e convivência.
- Aos amigos do laboratório de carotenóides e bioaromas, Lísia, Giovana, Cíntia, Cedenir e Ana paula
- À minha amiga, Elizângela, pelas nossas lutas, conquistas e nossa grande amizade.
- Aos meus queridos amigos da colônia gaúcha. Guris e gurias, por todos os momentos de alegria, união e por nossa carinhosa amizade. Sinto-me honrada com o título de cidadã honorária, adoro todos vocês!
- Aos professores, pelos ensinamentos e experiências.
- Aos funcionários da secretaria do DCA, Jardete, Marcos, Marcão e Wellington, pela dedicação e atenção.
- Aos funcionários da secretaria de pós graduação, Cosme, Jaime, Ricardo e Douglas, pela presteza e atenção.
- Aos funcionários da biblioteca e demais funcionários que participam das atividades da FEA, pela atenção e bom atendimento.
- Às minhas queridas amigas, Érika e Patrícia, por todos esses anos de profunda e sincera amizade.
- À minha ajudante e amiga, Ângela, por todo empenho e dedicação.
- À todos os meus amigos que participaram deste momento de grande importância para mim, pelo apoio e amizade. À todos aqueles que de alguma forma estiveram presentes nesta caminhada, o meu “Muito Obrigada!!!”

“E quem um dia irá dizer que existe razão nas coisas feitas pelo coração? E quem irá dizer que não existe razão?” (Legião Urbana)

## ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	xi
SUMARY.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	03

### CAPÍTULO 1

#### CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESENÇA DE NITRATO EM FÓRMULA INFANTIL. UMA REVISÃO

RESUMO.....	06
SUMARY.....	07
1. INTRODUÇÃO.....	08
2. OCORRÊNCIA DO NITRATO NO SORO LÁCTEO.....	09
3. OCORRÊNCIA DO NITRATO EM LEITE.....	11
4. EXPOSIÇÃO HUMANA AO NITRATO.....	12
5. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS.....	15
6. METODOLOGIA ANALÍTICA.....	23
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

### CAPÍTULO 2

#### DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITRATO EM FÓRMULAS INFANTIS PARA LACTENTES POR SISTEMA FIA E ESTIMATIVA DA SUA EXPOSIÇÃO EM LACTENTES.

RESUMO.....	39
SUMARY.....	40
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	42
3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	48

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
CONCLUSÕES GERAIS.....	68



## TABELAS

### **CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESENÇA DE NITRATO EM FÓRMULA INFANTIL. UMA REVISÃO**

<b>Tabela 1.</b> Níveis de nitratos encontrados em amostras de leite em pó.....	12
<b>Tabela 2.</b> Estimativa de ingestão de nitratos e nitritos em diversos países.....	14

### **CAPÍTULO 2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITRATO EM FÓRMULAS INFANTIS PARA LACTENTES POR SISTEMA FIA E ESTIMATIVA DA SUA EXPOSIÇÃO EM LACTENTES.**

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros de validação do método analítico utilizado na determinação de nitrato em amostras de fórmula infantil para lactentes.....	52
<b>Tabela 2.</b> Porcentagem de recuperação de nitrato nas amostras estudadas, em 2 níveis de fortificação da amostra (1,0 mg kg <sup>-1</sup> e 2,0 mg kg <sup>-1</sup> ).....	52
<b>Tabela 3.</b> Teor de nitrato em amostras de fórmula infantil para lactentes, expresso como valor médio e estimativa do desvio padrão absoluto (S).....	55
<b>Tabela 4.</b> Exposição diária ao nitrato pelo lactente veiculadas através da fórmula infantil, da água utilizada no preparo das mamadeiras e exposição total.....	58

## FIGURAS

### CAPÍTULO 2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITRATO EM FÓRMULAS INFANTIS PARA LACTENTES POR SISTEMA FIA E ESTIMATIVA DA SUA EXPOSIÇÃO EM LACTENTES.

<b>Figura 1.</b> Diagrama do sistema FIA para determinação de nitrato.....	45
<b>Figura 2.</b> Curva analítica de nitrato.....	50
<b>Figura 3</b> Diagrama do nitrato.....	51

## RESUMO GERAL

Os sais de nitrato e nitrito estão naturalmente presentes no ambiente, na água e nos vegetais, sendo também utilizados como aditivo alimentar, principalmente como agente antimicrobiano em queijos e produtos cárneos. Assim, o soro obtido de leite adicionado de nitrato na produção de queijos poderá conter níveis elevados desse íon e, visto que é utilizado como ingrediente de fórmulas infantis para lactentes, poderá servir de veículo de nitrato nesse alimento. O nitrato é considerado um composto de, relativamente, baixa toxicidade sendo que o risco que oferece à saúde humana depende de sua redução a nitrito, o qual pode conduzir a metemoglobinemia ou formar compostos N-nitrosos. O Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) estabeleceu uma ingestão diária aceitável (IDA) para nitrato e nitrito de 0-3,7 mg de íon nitrato  $\text{kg}^{-1}$  de peso corpóreo e de 0-0,07 mg de íon nitrito  $\text{kg}^{-1}$  de peso corpóreo, respectivamente, ressaltando que a IDA não deve ser aplicada às crianças menores de três meses de idade. O leite materno é o alimento fundamental para o desenvolvimento sadio do lactente, mas em alguns casos há a necessidade de se utilizar a fórmula infantil. Assim, a mamadeira preparada com fórmula infantil é a principal fonte de exposição ao nitrato para crianças com idade inferior a três meses. No presente trabalho foi validado um método para a determinação de nitrato utilizando análise por injeção em fluxo (FIA), com determinação espectrofotométrica através da formação do complexo  $\text{FeSCNNO}^+$ . Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros: faixa linear (0,50 – 3,00  $\text{mg L}^{-1}$ ), linearidade 0,997, repetibilidade intra-ensaio (RSD 1,60%;  $n=10$ ), limite de detecção (0,3  $\text{mg kg}^{-1}$ ), limite de quantificação (1,00  $\text{mg kg}^{-1}$ ) e exatidão (94 a 108%). O método foi utilizado para a determinação de nitrato em fórmula infantil para lactentes em amostras disponíveis no estado de São Paulo. Os teores de nitrato nas amostras analisadas ( $n=30$ ) foram menores do que 21,8  $\text{mg kg}^{-1}$ , sendo que 09 amostras apresentaram níveis abaixo do limite de quantificação do método e 21 apresentaram um valor médio de  $7,0 \pm 0,35 \text{ mg kg}^{-1}$ . Estimou-se a ingestão diária de nitrato através do consumo das mamadeiras preparadas com a fórmula infantil, na faixa etária de 0 a

12 meses. A estimativa da ingestão de nitrato pelo lactente foi obtida considerando-se a fórmula infantil e a água utilizada no preparo das mamadeiras, e variou entre 0,37 a 2,69 mg/kg pc/dia. Cabe destacar que os maiores valores de ingestão foram verificados nos lactentes menores de três meses de idade. Os resultados obtidos indicam a necessidade de estabelecer legislação específica para a presença de nitrato nas fórmulas infantis, em particular naquelas destinadas a lactentes de até 12 semanas de vida, para assim poder-se realizar ações visando o controle da presença de nitrato nessa matriz, visto que lactentes até o terceiro mês de vida são particularmente susceptíveis a formação de metemoglobina devido à exposição ao nitrato.

Palavras chaves: fórmula infantil, nitrato, análise por injeção em fluxo (FIA).

## SUMMARY

Nitrates and nitrites are naturally present in the environment, in water and vegetables origin, or are used as food additives, mainly as antimicrobial preservatives in cheese and cured meats. Thus, curds from milk with added nitrate in cheese production, may contain higher levels of this ions, and since it is used as ingredient in infant formulas, it could be a source of nitrate in this food. Nitrate is considered a compound of relatively low toxicity and its risk to the human health depend on its reduction to nitrite, which can lead to the formation of methemoglobinemia or form N-nitroso compounds. The FAO/OMS Expert Committee on Food Additives (JECFA) established an acceptable daily intake (ADI) for nitrate of 0-3.7 mg kg<sup>-1</sup> of body weight expressed as ion nitrate, and for nitrite of 0-0.07 mg kg<sup>-1</sup> of body weight, expressed as nitrite ion, emphasizing that the ADI does not apply to infants less than three months old. Breast milk is the fundamental food for the healthy development of infants, but in some cases the use of infant formula is necessary. The baby bottles prepared with infant formula thus becomes the main source of nitrate exposure for babies less than three months old. In the present work it was validated a method to quantify nitrate using flow injection analysis (FIA), with spectrophotometric determination based on the formation of FeSCNNO<sup>+</sup>. For this purpose the following parameters were evaluated: linear range (0,50 – 3,00 mg L<sup>-1</sup>), linearity 0.9917; intra-assay accuracy (RSD 1.60%; n=10), detection limit (0,3 mg kg<sup>-1</sup>), quantification limit (1,00 mg kg<sup>-1</sup>) and recovery (94 to 108%). The method was used for the determination of nitrate in infant formulas available in the retail market of the state of São Paulo. The nitrate level in the samples (n=30) was lower than 21.8 mg kg<sup>-1</sup>, in this regard 09 samples presented a nitrate level lower than the determination limit of the method and 21 showed medium value of 7.0 ± 0.35 mg kg<sup>-1</sup>. The daily nitrate intake was estimated considering the average consumption of baby bottles prepared with the infant formula, for children aging 0 – 12 months old. An estimation of the daily nitrate of nitrate by the infants was obtained considering the infant formula and the water used in the preparation of the baby bottles, and ranged from 0.37 to 2.69

mg/kg pc/day. It should be emphasized that the higher values of ingestion were found for infants less than three months old. The results indicate the need to establish specific legislation for the presence of nitrate in infant formulas, in particular for those destined to infants up to 12 weeks old, in order to be able to conduct actions to control the presence of nitrate in this matrix, since infants since the third month of life are particularly susceptible to the formation of methemoglobin due to nitrate exposure.

Keywords: infant formula, nitrate, flow injection analysis (FIA).

## INTRODUÇÃO GERAL

Sais de nitrato e nitrito estão naturalmente presentes em alimentos de origem vegetal, animal e na água, sendo também utilizados como conservante em produtos cárneos e queijos (ARAÚJO & MIDIO, 1990; FERREIRA & CAMARGO, 1993; DUARTE & MÍDIO, 1997).

Nitrato e nitrito são utilizados na indústria de queijos para evitar o estufamento tardio, problema que aparece somente após duas ou três semanas de fabricação. O estufamento tardio nos queijos é, na sua grande maioria, causado pelo *Clostridium tyrobutyricum* cuja presença causa a fermentação do lactato que na massa do queijo produz ácido butírico, gás carbônico e hidrogênio, alterando também, o odor e o sabor do produto (DONNELLY & BUSTA, 1981).

O soro é um subproduto do leite obtido durante a produção de queijo ou da caseína, sendo utilizado como substituto do leite e como fonte de proteína em bebidas lácteas e no leite em pó (DUARTE & MÍDIO, 1997a.).

A legislação brasileira considera impróprio para consumo o leite de vaca que contenha nitrato ou nitrito (BRASIL, 1952). No entanto dados obtidos da literatura revelam que nitratos podem estar naturalmente presentes nesse alimento em baixas concentrações, em teores inferiores a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  em leite fluido e  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  em leite em pó. Essas concentrações podem ser aumentadas, e ainda ocorrer a presença de nitrito, quando o soro proveniente da fabricação de queijos é adicionado no leite em pó (WALKER, 1990; DUARTE & MIDIO, 1997).

A fórmula infantil para lactentes, quando utilizada em substituição ao leite materno, é o alimento fundamental para o desenvolvimento das crianças até a idade de seis meses. Entretanto, também é a principal fonte de exposição ao nitrato em lactentes. Nitratos e nitritos podem causar efeitos tóxicos ao organismo dependendo da quantidade ingerida e da susceptibilidade do organismo, principalmente em crianças com predomínio da hemoglobina fetal (JAFFÉ, 1981; FERNÍCOLA, 1989; McKNIGHT et al., 1997; ECHANIZ et al, 2001).

Os efeitos nocivos do nitrato estão relacionados ao fato de ser facilmente convertido a nitrito, tanto no alimento como no organismo humano. Os efeitos

tóxicos mais relevantes decorrentes da ingestão de nitrato e de nitrito são a metemoglobinemia, em neonatos e em indivíduos com deficiência congênita de metemoglobina-redutase ou deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a formação *in vivo* de N-nitrosaminas (WALKER, 1990; TRICKER & PREUSSMANN, 1991; GANGOLLI et al., 1994). Assim, a exposição de lactentes ao nitrato pode levar à morte, principalmente em crianças com menos de três meses de idade, por apresentarem uma deficiência fisiológica transitória da metemoglobina redutase (diaforase reduzida) ou de seu co-fator NADH (JAFFÉ, 1981).

O Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares - JECFA, em sua 59<sup>a</sup>. Reunião em 2003, reavaliou os limites da Ingestão Diária Aceitável (IDA) para os íons nitrito e nitrato, com base nos últimos estudos toxicológicos existentes (WHO, 2003). A IDA é a quantidade de um aditivo (no caso nitrato e nitrito) que pode ser ingerido por toda a vida sem provocar um dano à saúde humana. O Comitê estabeleceu para o nitrito uma IDA de 0-0,07 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo, expressa como íon nitrito (WHO, 2003). Para o nitrato, o Comitê manteve a IDA de a 0-3,7 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo, expresso como íon nitrato, a qual tinha sido estabelecida na sua 44<sup>a</sup> reunião (WHO, 1996).

A ingestão média estimada de nitrato (níveis médios em cada alimento e dados médios de consumo) varia entre 52 e 407 mg/pessoa/dia, sendo que nem todas as pesquisas levam em consideração a água consumida. A água, com concentração de nitrato relativamente alta, representa um importante aumento na ingestão diária (WALKER, 1990; YSART et al., 1999; PETERSEM & STOLTZE, 1999).

Em vista dos problemas que o nitrato pode causar à saúde se ingerido em excesso, principalmente em lactentes, o objetivo do presente trabalho foi de validar metodologia analítica para a determinação de nitrato em fórmula infantil para lactentes, utilizando análise por injeção em fluxo (FIA), com o intuito de analisar amostras de fórmula infantil para lactentes disponíveis no mercado e, assim, estimar a exposição ao nitrato por parte de lactentes.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A.C.P.; MÍDIO, A.F. Nitratos y nitritos em alimentos infantilis industrializados y caseros. *Alimentaria*, Madrid, 27 (209), 69-75, 1990.
- BRASIL. Decreto nº 30691, art. 542, do Ministério da Saúde da Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS/MS. *Diário Oficial da União*, 07 de julho 1952. Disponível em (<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>). Acesso em 03/03/04.
- DONELLY, L.S.; BUSTA, F.F. Anaerobic sporeforming microorganism in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 64, 1, 161-166, 1981.
- DUARTE, M.; RIBEIRO, A.; MIDIO, A.F. Contenido de nitrato em distintas variedades de leche comercializadas em países del mercosur. *Alimentaria*, 19-21, 1997.
- DUARTE M.; MIDIO, A.F. Sorolácteo: características nutricionais e riscos na sua utilização. *Higiene Alimentar*, 11(47), 23-25, 1997 a.
- ECHANIZ, J.S.; FERNANDEZ, J.B.; RASO, S.M. Methemoglobinemia and Consumption of Vegetables in Infantis. *Pediatrics*, 107 (5), 2001.
- FERNÍCOLA, N.A.G.G. Metahemoglobina infantil causada por nitratos. *Boletim Oficial Sanitary Panamericana*, 106, 32-39, 1989.
- FERREIRA, S.M.R.; CAMARGO, L. Aditivos em alimentos. *Boletim CEPPA*, 11,160-176, 1993.
- GANGOLLI, S.D.; van den BRANDT, P.A.; FERON, V.J.; JANZOWSKY, C.; KOEMAN, J.H.; SPEIJERS, G.J.A.; SPIEGELHALDER, B.; WALKER, R.; WISHNOK, J.S. Nitrate, Nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of pharmacology Environmental of toxicology and pharmacology*. Section 292, 1-38, 1994.
- JAFFÉ, E.E. Methaemoglobinaemia. *Clinical Haematology*, 10, 99-122, 1981.

McKNIGHT, G.M.; SMITH, L.M.; DRUMMOND, R.S.; DUNACN, C.W.; GOLDEN, M.; BENJAMIN, N. Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut*, 40, 211-214, 1997.

PETERSEN, A.; STOLTZE, S. Nitrate and nitrite in vegetables on the Danish market content and intake. *Food Additives and Contaminants*; 16, 291-299, 1999.

TRICKER, A.R.; PREUSSMANN R. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanism and carcinogenic potential. *Mutation Research*, 259, 277-289, 1991.

WALKER, R. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Additives and Contaminants*, 7, 717-768, 1990.

WHO. Food Additives Series No 35. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives. Forty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva, 1996.

WHO. Food Additives Series No 50. Safety Evaluation of Certain Food Additives. Fifty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva, 2003.

YSART, G.; MILLER, P.; BARRETT, G.; FARRINGTON, D.; LAWRENCE, P.; HARRISON, N. Dietary exposures to nitrate in the UK. *Food Additives Contaminants*, 16, 521-532, 1999.

## **CAPÍTULO 1**

### **CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESENÇA DE NITRATO EM FÓRMULA INFANTIL PARA LACTENTES. UMA REVISÃO**

Este trabalho será submetido para a publicação na revista da Sociedade Brasileira de Toxicologia

## CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESENÇA DE NITRATO EM FÓRMULA INFANTIL PARA LACTENTES. UMA REVISÃO

### RESUMO

Os sais de nitrato e nitrito estão naturalmente presentes no ambiente, na água e nos vegetais, sendo também utilizados como aditivo alimentar, principalmente como agente antimicrobiano em queijos e produtos cárneos. Assim, o soro obtido de leite adicionado de nitrato na produção de queijos poderá conter níveis elevados desse íon e, visto que é utilizado como ingrediente de fórmulas infantis para lactentes, poderá servir de veículo de nitrato nesse alimento. O nitrato é considerado um composto de, relativamente, baixa toxicidade sendo que o risco que oferece à saúde humana depende de sua redução a nitrito, o qual pode conduzir a metemoglobinemia ou formar compostos N-nitrosos. O Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) estabeleceu uma ingestão diária aceitável (IDA) para nitrato e nitrito de 0-3,7 mg de íon nitrato  $\text{kg}^{-1}$  de peso corpóreo e de 0-0,07 mg de íon nitrito  $\text{kg}^{-1}$  de peso corpóreo, respectivamente, ressaltando que a IDA não deve ser aplicada às crianças menores de três meses de idade. O leite materno é o alimento fundamental para o desenvolvimento sadio do lactente, mas em alguns casos há a necessidade de se utilizar a fórmula infantil. Assim, a mamadeira preparada com fórmula infantil é a principal fonte de exposição ao nitrato para crianças com idade inferior a três meses. O presente artigo abordou estudos recentes em relação ao teor de nitrato em fórmula infantil para lactentes, assim como os aspectos toxicológicos e de legislação deste íon.

Palavras-chaves: fórmula infantil; leite; nitrato.

# CONSIDERATIONS ABOUT THE PRESENCE OF NITRATE IN INFANT FORMULA. A REVIEW

## SUMMARY

Nitrates and nitrites are naturally present in the environment, in water and vegetables origin, or are used as food additives, mainly as antimicrobial preservatives in cheese and cured meats. Thus, curds from milk with added nitrate in cheese production, may contain higher levels of this ions, and since it is used as ingredient in infant formulas, it could be a source of nitrate in this food. Nitrate is considered a compound of relatively low toxicity and its risk to the human health depend on its reduction to nitrite, which can lead to the formation of methemoglobinemia or form N-nitroso compounds. The FAO/OMS Expert Committee on Food Additives (JECFA) established an acceptable daily intake (ADI) for nitrate of 0-3.7 mg kg<sup>-1</sup> of body weight expressed as ion nitrate, and for nitrite of 0-0.07 mg kg<sup>-1</sup> of body weight, expressed as nitrite ion, emphasizing that the ADI does not apply to infants less than three months old. Breast milk is the fundamental food for the healthy development of infants, but in some cases the use of infant formula is necessary. The baby bottles prepared with infant formula thus becomes the main source of nitrate exposure for babies less than three months old. The present article present current studies in relation to the nitrate level in infant formula, as well as the toxicological legislation and aspects of this ion.

Keywords: infant formula; milk; nitrate.

## 1. INTRODUÇÃO

O nitrato está naturalmente presente no ambiente, na água e em alimentos de origem vegetal, sendo utilizado como aditivo alimentar na forma de seus sais de sódio ou potássio principalmente como conservante e agente antimicrobiano em produtos cárneos e queijos (ARAÚJO & MÍDIO, 1990; FERREIRA & CAMARGO, 1993; DUARTE E MÍDIO, 1997).

Em produtos cárneos, nitratos e nitritos são utilizados como aditivos intencionais como inibidores do crescimento do *Clostridium botulinum* e em queijos para evitar o estufamento tardio causado, na maioria das vezes, pelo *Clostridium tyrobutyricum*, cuja presença produz alteração no odor e sabor do alimento (KYRIAKIDIS et al., 1997). O *Clostridium butyricum*, *C. sporogenes* e *C. pausterianum* também podem causar o mesmo problema nos queijos (DONNELLY & BUSTA, 1981).

A importância do nitrato para a saúde está relacionada ao fato de ser facilmente convertido a nitrito tanto no alimento como no organismo humano. Os efeitos tóxicos mais relevantes decorrentes da ingestão de nitrato e de nitrito são a metemoglobinemia, em neonatos e em indivíduos com deficiência congênita de metemoglobina-redutase ou deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e formação *in vivo* de N-nitrosaminas (WALKER, 1990; TRICKER & PREUSSMANN, 1991; GANGOLLI et al., 1994).

O comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) estabeleceu uma ingestão diária aceitável (IDA) para nitrato e nitrito de 0-3,7 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo, expresso como íon nitrato e de 0-0,07 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo, expresso em íon nitrito, respectivamente, (WHO, 2003) ressaltando que a IDA não deve ser aplicada às crianças menores de três meses de idade (WHO, 1996).

Cabe destacar que na produção do queijo tem-se a formação do soro lácteo, utilizado como fonte protéica em leites e derivados (OLIVEIRA & GLÓRIA, 1993).

Em crianças menores de três meses, a mamadeira preparada com a fórmula infantil para lactentes é a principal fonte de exposição ao nitrato. Todavia, em substituição ao leite materno, este será o alimento fundamental para o desenvolvimento do lactente neste período. Nitratos e nitritos poderão causar efeitos tóxicos ao organismo do lactente dependendo da quantidade ingerida e da sua susceptibilidade, principalmente em crianças com predomínio da hemoglobina fetal (WHO, 1978; JAFFÉ, 1981; FERNÍCOLA, 1989; McKNIGHT et al., 1999; ECHANIZ et al, 2001).

O objetivo do presente artigo de revisão foi abordar dados recentes em relação ao teor de nitrato em leite em pó infantil para lactentes, assim como os aspectos de metodologia analítica, toxicológicos e de legislação deste íon.

## 2. OCORRÊNCIA DO NITRATO NO SORO LÁCTEO

Em queijos a adição de nitrato e nitrito evita o chamado estufamento tardio, problema que aparece duas ou três semanas após a fabricação do alimento. É causado, na maioria das vezes, pelo *Clostridium tyrobutyricum* cuja presença provoca a fermentação do lactato na massa do queijo produzindo ácido butírico, gás carbônico e hidrogênio, alterando, também, o odor e sabor do alimento (DONELLY & BUSTA, 1981; FURTADO, 1985; KYRIAKIDS, et al., 1997).

O nitrato em si não é o responsável pela prevenção do estufamento tardio dos queijos. Todavia, uma vez adicionado ao leite, este é reduzido enzimaticamente pela xantina oxidase a nitrito, que inibe o desenvolvimento do microrganismo, embora outros fatores como temperatura de estocagem, pH, microflora também colaborem na redução de nitrato a nitrito (GRAY et al.; 1979).

No processo de produção do queijo tem-se a formação de soro lácteo amplamente utilizado como ingrediente na produção de alimentos industrializados, entre outros, de bebidas lácteas e de leite em pó. O soro lácteo, ou simplesmente

soro, é um subproduto do leite obtido durante a coagulação nos processos de produção de queijo ou de caseína (MORR, 1989).

O soro líquido é constituído de mais de 93% de água, porém contém quase metade dos nutrientes originais do leite como a lactose, vitaminas, proteínas solúveis, sais minerais, sendo que, esta fração possui muito pouca gordura (MORR, 1989; NEVES, 1993). Assim, o soro é uma fonte econômica de nutrientes que oferece uma série de benefícios nutricionais e funcionais em alimentos como realce de sabor e cor, melhora de textura, emulsificação, estabilização, dispersão e aumento na vida de prateleira (De WIT, 1989; SMITHERS et al., 1996).

Entretanto, o soro lácteo é um produto capaz de promover poluição ambiental quando descartado. Sua descarga em cursos de água pode provocar a destruição da flora e da fauna devido a alta demanda biológica de oxigênio (DBO) que é na ordem de 30 g a 40 g de O<sub>2</sub> por litro de soro (NEVES, 1993). Uma base de cálculo de referência usada na prática consiste em considerar que cada dez unidades de leite integral produzem uma unidade de queijo e nove unidades de soro líquido (ABREU, 1986).

O soro doce fluido pode ser transformado em soro em pó, soro com teor de lactose reduzido, soro desmineralizado, soro parcialmente desmineralizado, concentrados protéicos de soro (CPS) ou isolados protéicos de soro (IPS) (GIESE, 1994). A tendência mundial, com a preocupação do reaproveitamento do soro, é desenvolver novas técnicas para intensificar seu uso na alimentação humana.

Atualmente as aplicações do soro e suas frações são abundantes em diferentes setores da indústria de alimentos, dentre eles na produção de queijos e correlatos, bebidas lácteas, panificação e produtos similares, alimentos infantis, produtos dietéticos, sopas, bases para molhos, iogurte, chocolates e sorvetes (PONSANO, 1992; HUFFMAN, 1996).

Dados obtidos da literatura revelam que nitratos podem estar presentes naturalmente no leite em baixas concentrações. Os teores raramente são maiores do que 5,0 mg L<sup>-1</sup> e 30,0 mg kg<sup>-1</sup> para leite fluido e leite em pó, respectivamente. Estas concentrações podem ser aumentadas quando se adicionar ao leite em pó, o soro lácteo proveniente da produção de queijos onde foram utilizados sais



desses íons como aditivos (DUARTE & MÍDIO, 1996).

Apesar do valor nutricional do soro, cuidados devem ser dispensados a alimentos destinados à alimentação infantil, pois crianças são mais susceptíveis do que os adultos aos efeitos adversos dos nitratos e nitritos (WALKER, 1990; VITTOZZI, 1992; SARASUA & SAVITZ, 1994).

### 3. OCORRÊNCIA DO NITRATO EM LEITE

Os sais de nitrato e nitrito ocorrem naturalmente nos alimentos de origem vegetal, ou são adicionados durante o processamento de alimentos de origem animal. Devido a presença de nitratos no ambiente, nos alimentos e na água ingerida pelos animais, o leite é uma fonte de nitrato, embora em concentrações não elevadas (GREEN et al, 1982).

O leite é um produto de secreção das glândulas mamárias dos mamíferos e constitui uma das principais fontes de proteína na alimentação humana (SGARBIERI, 1996), sendo que no leite humano foram determinados níveis abaixo de 5,0 mg nitrato íon L<sup>-1</sup> (SUKEGAWA e MATSUMOTO, 1975).

Dados da literatura revelam que os níveis de nitrato no leite *in natura* também são inferiores a 5,0 mg L<sup>-1</sup> para o leite fluido e de 30,0 mg kg<sup>-1</sup> para o leite em pó (WALKER, 1990; DUARTE & MÍDIO, 1997) (Tabela 1).

OLIVEIRA & GLÓRIA, 1993, analisaram alimentos infantis comercializados no Brasil contendo soro. Das 693 amostras analisadas 100% apresentavam nitrato e 60% nitrito, em níveis que variaram de 4,9 a 1250 ppm em nitrato de potássio e 1,1 a 4,6 ppm em nitrito de sódio.

Para se afirmar com segurança se as concentrações de nitrato e nitrito em soro são provenientes de ocorrência natural ou do uso de aditivos, deve-se conhecer a procedência da amostra, constatação que às vezes se torna difícil (DUARTE & MÍDIO, 1996). Entretanto, a presença de nitrato em fórmulas infantis torna-se um aditivo acidental, sendo proveniente do soro resultante do leite

utilizado na fabricação de queijos, o qual poderá ter sido adicionado de nitrato.

**Tabela 1.** Níveis de nitratos encontrados em amostras de leite em pó\*.

<i>Tipo</i>	<i>Marca</i>	<i>Procedência</i>	<i>Nitrato (mg kg<sup>-1</sup>)</i>
Integral	A	Córdoba - Argentina	11,45
	B	Santa Fé - Argentina	20,04
	C	Buenos Aires - Argentina	25,39
	D	Cañuelas - Argentina	12,96
	E	Cañuelas - Argentina	32,92
	F	Montevideo - Uruguai	21,03
	G	Paraná - Brasil	<0,26
	H	Rio Grande do Sul - Brasil	<0,26
	I	Bahia - Brasil	12,78
	J	São Paulo - Brasil	34,05
	K	Minas Gerais - Brasil	29,48
	L	Minas Gerais - Brasil	5,09
	M	Minas Gerais - Brasil	8,63
	N	Rio de Janeiro - Brasil	6,07
	O	Goiás - Brasil	8,23
Desnatado	P	Santa Fé - Argentina	5,59

\* (Duarte e Mídio, 1997)

#### 4. EXPOSIÇÃO HUMANA AO NITRATO

A exposição diária ao nitrato, por parte da população em geral, é influenciada tanto pelos hábitos culturais, como estilo de vida e localização geográfica. Condições de cultivo, variedade, armazenamento, processamento, dieta e preparo dos alimentos influenciam na quantidade de nitrato ingerida (GENTO, 1994<sup>a</sup>, 1994<sup>b</sup>).

A dieta constitui uma importante fonte de exposição do nitrato e nitrito presente em alimentos como componentes naturais ou como aditivos intencionais. A dieta ocidental é rica em peixes salgados e queijos que contribuem com valores relativamente altos de nitrito (WALKER, 1990).

A ingestão média de nitrato estimada (níveis médios em cada alimento e dados médios de consumo) varia entre 52 e 422 mg/pessoa/dia, sendo que nem todas as pesquisas levam em consideração a água consumida (WALKER, 1990; PENNINGTON, 1998; YSART et al., 1999; PETERSEM & STOLTZE, 1999). A água com alto teor de nitrato representa uma importante fonte de exposição na ingestão diária total de nitrato (WALKER, 1990). A tabela 2 apresenta a estimativa de ingestão de nitrato e nitrito em diferentes países.

Para as fórmulas infantis de lactentes, as quais requerem diluição com água antes de serem consumidas, a principal fonte de nitrato poderá ser pela água e uma menor parte pelo leite em pó. Levando em consideração a ingestão de 165 mL/kg de peso corpóreo/dia para uma criança de três meses pesando 5,6 kg, onde os alimentos preparados com água contendo o limite máximo permitido na água ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) a ingestão deverá ser de 46 mg/dia ( $8,2 \text{ mg/kg}$  de peso corpóreo/dia) (MAFF, 1992). O nível de nitrato ingerido por crianças desmamadas geralmente é baixo, têm sido estimado que a ingestão por lactentes de 9 a 12 meses é de, aproximadamente, 37 mg nitrato/dia (MAFF, 1987).

**Tabela 2.** Estimativa de ingestão de nitratos e nitritos em diversos países\*

<i>País</i>	<i>Média de ingestão diária (mg/dia)</i>	
	<b>Nitrato</b>	<b>Nitrito</b>
França	150,7**	>3,0
Alemanha	68**	2,0 – 6,0
Itália	245	–
Países Baixos (Holanda)	71	0,6
Noruega	43	1,8
Polônia: Adulto	178	–
Criança 1 – 3 anos	142	4,0
Bebê 3 – 12 meses	30	1,4
Suíça	125	–
Inglaterra	102	–
Inglaterra	88 – 407	–
Inglaterra	97	–
Inglaterra	84	0,3 – 0,9
Inglaterra	149	2,1
Estados Unidos: Dieta normal	103	1,2
Carne curada (alta conc.)	107	2,6
Vegetariana	367	1,2
Água (rica em nitrato)	319	1,2
Estados Unidos	137	3,9
Estados Unidos	53	0,5
Estados Unidos	96	0,8
Estados Unidos	137	0,9

\* Fonte: WALKER, 1990

\*\* Excluindo ingestão de água

## 5. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

O nitrato e nitrito podem causar efeito tóxico em indivíduos expostos através de alimentos, dependendo da quantidade ingerida e da susceptibilidade do organismo humano (DUARTE & MÍDIO, 1996).

A importância de nitrato para a saúde humana está relacionada ao fato do nitrato ser facilmente convertido a nitrito. Os efeitos tóxicos mais relevantes decorrentes da ingestão de nitrato e de nitrito são a metemoglobinemia, em neonatos e em indivíduos com deficiência congênita de metemoglobina-redutase ou deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a formação *in vivo* de N-nitrosaminas (JAFFÉ, 1981; FERNÍCOLA, 1989; WALKER, 1990; ECHANIZ et al, 2001).

Para crianças com idade inferior a três meses os nitratos representam um grande risco, devido ao pH mais elevado (básico) na mucosa duodenal que permite o crescimento de bactérias, capazes de transformar o nitrato em nitrito, sendo este muito mais tóxico. Além disso, no sangue de crianças dessa idade existe uma quantidade considerável de hemoglobina fetal (hemoglobina F) que se transforma em metemoglobina mais facilmente que a hemoglobina adulta (hemoglobina A) (JAFFÉ, 1981; FERNÍCOLA, 1989; McKNIGHT et al., 1999; ECHANIZ, 2001). A concentração letal de metemoglobina não é conhecida, mas foi observado que em concentrações superiores a 50% ocorre morte (BORONAT et al., 1982).

Outro efeito tóxico associado à ingestão de nitrato e nitrito é a formação *in vivo* de N-nitrosaminas. As N-nitrosaminas, compostos orgânicos conhecidos desde longa data, tornaram-se objeto de intensivos estudos toxicológicos a partir de 1956, quando foi relatada pela primeira vez a indução de tumores no fígado de ratos alimentados com ração contaminada com N-nitrosodimetilamina (NDMA). Desde então, muitas pesquisas têm sido feitas sobre os efeitos biológicos causados por N-nitrosaminas, e a maioria dos compostos testados mostraram-se carcinogênicos (WALKER, 1990; TRICKER & PREUSSMANN, 1991; GANGOLLI et al., 1994).

O íon nitrato é considerado de baixa toxicidade, mas quando reduzido a nitrito pode apresentar um alto risco à saúde, sendo assim de grande importância considerar as fontes exógenas de nitrato ao corpo humano.

### **5.1. Absorção, Distribuição e Excreção**

Em humanos, o nitrato ingerido pela dieta é rapidamente absorvido na parte superior do trato digestivo e equilibrado com os fluidos do corpo e secretado na cavidade oral através das glândulas salivares (BARTHOLOMEW & HILL, 1984; CORTAS & WAKID, 1991). Apesar de existir grande variabilidade entre indivíduos, em média 25% do nitrato ingerido por via oral são secretados na saliva (SPIEGELHALDER et al., 1976; TANNENBAUM et al., 1976). O nível de nitrato salivar aumenta com a idade do indivíduo, sendo maior na idade adulta. A concentração salivar de nitrato em adultos varia entre 0,1 a 40 mmol L<sup>-1</sup> após ingestão de baixas e altas doses de nitrato, respectivamente (TUREK et al., 1980). O nitrato está presente no leite aparentemente por difusão passiva. Em crianças lactentes, o nível de nitrato salivar varia entre 0,1 e 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, com valor médio de 0,5 mmol L<sup>-1</sup>.

O nitrato também é secretado no trato gastrintestinal através das secreções gástricas (via glândulas parietais) e intestinais, incluindo a bile, o que leva à redução do nitrato a nitrito pela flora do intestino grosso. A secreção do nitrato no estômago também parece ser realizada através de transporte ativo, similar ao das glândulas salivares.

Sabe-se que a excreção urinária de nitrato está relacionada com a quantidade do íon ingerida. Entretanto, essa excreção pode exceder a sua ingestão, como consequência da síntese endógena de nitrato. No homem a excreção urinária, independente da dose, corresponde a 65 a 70 % do nitrato total ingerido. O máximo de excreção de nitrato ocorre após 5 horas da ingestão, retornando ao nível normal após 18 horas. Em indivíduos em jejum, o nível urinário de nitrato varia entre 10-20 mg/L (BARTHOLOMEW & HILL, 1984).

A excreção urinária do nitrato em crianças têm sido entre 80 a 100% da ingestão média (TUREK et al., 1980) ao passo que HEGESH & SHILOAH, 1982, afirmam que a excreção urinária do nitrato em crianças inclui a formação endógena do nitrato.

A vida média plasmática do nitrato é de aproximadamente 6.5 horas e o volume de distribuição é de aproximadamente 33 litros.

## 5.2. Síntese endógena de nitrato

Além da exposição através da dieta, há considerável síntese endógena de nitratos em humanos. A biosíntese de nitratos em adultos e crianças é estimada em aproximadamente  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$  peso corpóreo, expresso como íon nitrato (BARTHOLOMEW & HILL, 1984; WALKER, 1990; GANGOLLI et al., 1994), a qual pode ser aumentada devido a infecções gastrintestinais, visto que um considerável aumento na excreção urinária de nitrato foi verificado em crianças com diarreia aguda estimado em até  $15,0 \text{ mg kg}^{-1}$  peso corpóreo, expresso como íon nitrato (HEGESH & SHILOAH, 1982; WHO, 1996), onde também em adultos têm sido relatado similar aumento ( $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$  peso corpóreo, expresso como íon nitrato) (GANGOLLI et al., 1994). Entretanto a principal rota metabólica para a síntese endógena de nitrato é a conversão de arginina, por macrófagos, a óxido nítrico (NO), seguido da oxidação a anidro nitroso e reação deste em água para produzir nitrito, o qual é rapidamente oxidado a nitrato através da reação com hemoglobina (GANGOLLI et al., 1994; WALKER, 1996).

## 5.3. Biotransformação

No homem, e provavelmente na maioria das espécies animais, a redução do nitrato ocorre principalmente na cavidade bucal por bactérias anaeróbias facultativas presentes na superfície da língua. Aproximadamente 25% da ingestão

de nitrato é secretado na saliva da qual 20% é reduzido a nitrito, isto é, 5% da ingestão total (SPIEGELHALDER et al., 1976; WALTERS & SMITH, 1981), o que representa a principal fonte de nitrito para o homem (WALKER, 1996). Contudo, em menor quantidade, a redução do nitrato a nitrito *in vivo* também pode ser efetuada por bactérias entéricas e pela atividade da enzima nitrato redutase em mamíferos. Muitas espécies de microrganismos residentes no trato orogastrintestinal possuem atividade nitrato redutase (WALKER, 1996).

Em adultos em jejum, os valores de pH do estômago situam-se em torno de 1 a 2, condição não propícia para o crescimento bacteriano e, conseqüentemente, não ocorre redução bacteriana de nitratos. Entretanto, valores mais básicos de pH gástrico e conseqüentemente níveis elevados de nitrito, como  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ , têm sido observado em indivíduos aclorídricos, pacientes com úlcera gástrica, câncer do estômago, atrofia gástrica, assim como naqueles tratados com cimetidina e antiácidos (BARTSCH & MONTESANO, 1984).

Lactentes menores de três meses de idade são altamente susceptíveis à redução bacteriana no estômago, o que se deve à baixa produção de ácido gástrico (KROSS et al., 1992). Infecções gastrintestinais, as quais ocorrem freqüentemente em crianças, também contribuem para a redução do nitrato a nitrito.

Embora o interesse na redução oral do nitrato a nitrito esteja centrado na possível formação de compostos N-nitrosos, recentemente têm sido proposto que o nitrito salivar quando passa para o ambiente ácido estomacal, é rapidamente reduzido a óxido nítrico (NO) e outros óxidos de nitrogênio. O NO e soluções de nitrito acidificado, imitando as condições gástricas, têm demonstrado atividade antimicrobiana contra uma larga extensão de patógenos gastrintestinais. Além disso, NO é conhecido por ter propriedades vasodilatadoras e modulador da atividade plaquetária e, possivelmente da motilidade intestinal e microcirculação (McKNIGHT et al., 1997).



## 5.4. Efeitos do nitrato em humanos

### 5.4.1. Metemoglobinemia infantil

Em humanos, o mais importante efeito tóxico agudo como consequência da ingestão de nitrato decorre da sua conversão a nitrito e formação de metemoglobina (MetHb). O nitrito absorvido oxida o  $\text{Fe}^{2+}$  (íon ferro no estado ferroso) da hemoglobina (Hb) a  $\text{Fe}^{3+}$  (íon ferro no estado férrico) resultando na MetHb, a qual não se liga reversivelmente ao oxigênio, como acontece com a hemoglobina. Portanto, ocorre uma redução no transporte de oxigênio dos alvéolos pulmonares para os tecidos (JAFFÉ, 1981).

Cerca de 2 a 3% de hemoglobina é oxidada diariamente em metemoglobina, a qual através de reação catalizada pela enzima NADH-metemoglobina-redutase (NADH-diaforase) presente nos eritrócitos é convertida novamente em hemoglobina. Há vários fatores que mantêm fisiologicamente o íon ferro da hemoglobina no estado ferroso. O mais importante parece ser a enzima NADH-metemoglobina-redutase (CORTAS & WADIK, 1991). Entretanto a atividade desta enzima é baixa durante as 12 primeiras semanas de vida (NILSSON et al, 1990).

Quando o nível de exposição ao nitrito é elevado, o sistema de redução é saturado, resultando num aumento da concentração de MetHb no sangue. Níveis de metemoglobina de 10% produzem cianose assintomática, enquanto níveis de 20 a 50% levam à cianose, com sinais de hipóxia, astenia, dispnéia de esforço, dores de cabeça, taquicardia e perda da consciência. A concentração letal de MetHb não é conhecida, mas níveis superiores a 50% podem rapidamente levar ao coma e morte (BORONAT et al, 1982; KNOBELOCH et al., 2000). Quando a concentração de metemoglobina é superior a 15% a cor do sangue se torna achocolatada (FERNÍCOLA, 1989).

Crianças com menos de três meses de idade são mais susceptíveis a desenvolverem metemoglobinemia devido a vários fatores:

- (1) Baixa acidez gástrica, o que favorece ao crescimento de microrganismos que reduzem nitrato a nitrito antes de sua total absorção;

- (2) Imaturidade do sistema NADH MetHb redutase , que tende a desaparecer a partir dos quatro meses de idade;
- (3) A ingestão de água é maior que o peso corporal relativo (10 vezes superior a de adultos por unidade de peso corporal);
- (4) Hemoglobina fetal (60 a 80% da hemoglobina total em recém nascidos) se oxida mais facilmente em metemoglobina;
- (5) Em algumas raças, a deficiência congênita de glicose-6-fosfato desidrogenase em eritrócitos podem resultar em uma deficiência secundária de MetHb redutase (JAFFÉ, 1981; TOTAPALLY et al., 1998; McKNIGHT et al., 1999).

Em lactentes e crianças, devido a diluição da fórmula infantil em água, a maioria dos casos de metemoglobinemia está associada a altas concentrações de nitrato na água (teores acima de  $44,3 \text{ mg L}^{-1}$ ), principalmente em água de poços freqüentemente contaminada por bactérias, as quais reduzem o nitrato a nitrito (WHO, 1996). Entretanto, alimentos contendo altas concentrações de nitrato também podem estar envolvidos (KNOBELOCH, 2001).

O tratamento para reduzir a metemoglobinemia pode ser efetuado através da administração de azul de metileno ( $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), por via endovenosa ou intramuscular, ou administração de ácido ascórbico por via oral (BORONAT, 1982; TOTAPALLY, 1998). O azul de metileno atua como um carreador de elétrons em vias de redução que envolvem nicotinamida adenina dinucleotídeo difosfato (NADH) e flavoproteínas (FADH). Sendo este, muito eficiente no tratamento de metemoglobinemia. Entretanto não deve ser usado se existir a deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase. O ácido ascórbico atua independentemente na redução da metemoglobina, reduz o ferro férrico não-hêmico em estado ferroso, e também pode ser usado no tratamento da metemoglobinemia (TOTAPALLY, 1998).

#### 5.4.2. Carcinogenicidade

Embora a metemoglobinemia seja o principal efeito adverso agudo conseqüente da exposição ao nitrato, vários estudos sobre a alta exposição de nitrato têm sido associados a uma variedade de efeitos como a hipertrofia da tireóide, hipertensão e até efeitos carcinogênicos devido a formação de compostos N-nitrosos. Todos os efeitos têm sido observados em estudos epidemiológicos em seres humanos e são, freqüentemente, sustentados por estudo de fisiologia humana e animal (BRUNING-FANN & KANEENE, 1993).

O maior interesse com relação aos aspectos toxicológicos do nitrato e nitrito é a possível formação endógena de compostos N-nitrosos, em particular as N-nitrosaminas, as quais são consideradas potentes carcinógenos, além de apresentarem ação teratogênica e mutagênica em animais de laboratório (BARTSCH & MONTESANO, 1984; ROCHE et al, 1994).

A formação endógena de compostos N-nitrosos se inicia quando o nitrato é reduzido a nitrito por bactérias da cavidade bucal e o nitrito formado se transforma em óxido nítrico no estômago devido às condições favoráveis no local. Vários estudos *in vivo* indicam que a nitrosação pode ocorrer no estômago depois da ingestão de precursores da dieta (WALKER, 1990). A nitrosação também pode ocorrer exogenamente entre o nitrito, que foi formado por bactérias a partir do nitrato, e aminas e amidas presentes no alimento (VITTOZZI, 1992).

Estudos epidemiológicos sugerem que a alta ingestão de agentes nitrosantes e a formação intra-gástrica de N-nitrosaminas podem estar associadas com um alto risco de câncer gástrico, hepático e de esôfago (WU et al, 1993; STEFANI et al., 1998; MITACEK et al., 1999; KIM et al., 2002). Por outro lado, estudos epidemiológicos ou nutricionais indicam que fatores protetores naturais da dieta, tais como ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol, presentes principalmente em frutas e verduras, podem atuar como inibidores da formação de compostos N-nitrosos (MIRVISH, 1994; TERRY et al., 2001).

## 5.5. Limites toxicológicos e de resíduos

O comitê FAO/OMS em aditivos alimentares (JECFA), em sua 59ª reunião, reavaliou os limites da ingestão diária aceitável (IDA) para os íons nitrito e nitrato, com base nos últimos estudos toxicológicos existentes. O comitê concluiu que os efeitos tóxicos mais relevantes são:

- a) metemoglobinemia em neonatos e em indivíduos com deficiência congênita de metemoglobinemia-redutase ou glicose-6-fosfato-desidrogenase;
- b) formação endógena de compostos N-nitrosos;
- c) hipertrofia da zona adrenal glomerulosa em rato;
- d) genotoxicidade;

A toxicidade do nitrato, por sua vez, está relacionada com sua redução a nitrito (WHO, 2003).

Para o nitrito o JECFA estabeleceu uma IDA de  $0-0,07 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corpóreo, expresso como íon nitrito (WHO, 2003), e para o nitrato manteve a IDA de  $0-3,7 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corpóreo, expresso como íon nitrato, a qual tinha sido estabelecida em sua 44ª reunião (WHO, 1996). Importante ressaltar que a IDA não se aplica a crianças menores de três meses de idade (WHO, 1996).

No Brasil a adição de nitrato de sódio ou potássio em queijos, é permitida no limite de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  no produto a ser consumido (BRASIL, 1996). Todavia, a legislação brasileira considera impróprio para o consumo, o leite que contenha nitratos e nitritos em qualquer concentração (BRASIL, 1952).

A Portaria nº 34, de 13 de janeiro de 1998, publicada pelo Diário Oficial da União do Poder Executivo (BRASIL, 1998) aprova o regulamento técnico referente a alimentos de transição para lactentes e crianças de primeira infância.

O teor de nitrato permitido para produtos desidratados expresso em íon nitrato é de no máximo  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  do produto reconstituído; para alimentos líquidos o valor é o mesmo. Todavia, conforme a Portaria “Não estão cobertos por este regulamento as Fórmulas Infantis e os Alimentos Processados à Base de Cereais para Alimentação Infantil” (BRASIL, 1998).

No Brasil, o teor de nitrato e nitrito em água potável estabelece os limites de

50 mg L<sup>-1</sup>, calculado como nitrato e 0,02 mg L<sup>-1</sup>, calculado como nitrito (BRASIL, 2001). Os valores de ingestão diária aceitável (IDA) para nitratos e nitritos segundo a FAO/OMS, não devem ultrapassar os valores de 0-3,7 mg de íon nitrato kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo para nitrato e de 0-0,07 mg de íon nitrito kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo para nitrito (WHO, 2003).

## 6. METODOLOGIA ANALÍTICA

São vários os métodos analíticos descritos na literatura para a determinação de nitratos e nitritos em alimentos, água, material biológico, plantas e solo. Devido à conversão de nitrato a nitrito, existe atualmente um maior interesse na determinação de ambos, principalmente quando o substrato é alimento.

Os métodos espectroscópicos são os mais amplamente utilizados para a determinação de nitrato e nitrito, devido aos excelentes limites de detecção obtidos e ao fácil protocolo de análise (MOORCROFT et al., 2001). Diversas técnicas têm sido avaliadas, incluindo espectrofotometria (ZHI-QI et al., 1998; ZATAR et al., 1999; KAZEMZADEH & ENSAFI, 2001; MONSER et al., 2002; HAGHIGHI & TAVASSOLI, 2002; YUE et al., 2004), quimioluminescência (AOKI et al., 1997; MIKUSKA & VECERA, 2003), fluorescência (BULDT & KARST, 1999; LI et al., 2000; BISWAS et al., 2004) e espectroscopia de absorção atômica (SILVA et al., 1986). Outros métodos como potenciometria (PÉREZ-OLMOS et al., MOURZINA et al., 2003), polarografia (XIMENES et al., 2000), voltametria (CARPENTER & PLETCHER, 1995) e eletroforese capilar (ÖZTEKIN et al., 2002; MIYADO et al., 2003) têm sido empregados na determinação de nitrato em matrizes diversas.

O método oficial de análise para nitrato e nitrito baseia-se na redução do nitrato a nitrito em coluna de cádmio, seguido da determinação espectrofotométrica do azo composto formado na reação do nitrito com ácido

sulfanílico e N-(1-naftil) etilenodiamina (AOAC, 1990). A desvantagem dessa metodologia é o emprego de substâncias potencialmente carcinogênicas, como a N-(1-naftil) etilenodiamida.

De modo geral, o método espectrofotométrico para a determinação de nitrito e, indiretamente de nitrato, baseia-se nas seguintes reações químicas: (i) Nitração de um composto fenólico; (ii) Oxidação de um composto orgânico pelo nitrito e (iii) Diazotização. (USHER & TELLING, 1975). As reações de diazotização têm sido aplicadas com sucesso na análise de nitrato e nitrito por injeção em fluxo (FIA, do inglês flow injection analysis) (GINÉ et al, 1980). A técnica que consiste basicamente na introdução de um volume discreto e reprodutível de uma amostra em um fluido carregador não segmentado que vai sendo continuamente transportada até um detector, apresenta diversas vantagens frente aos outros métodos analíticos, principalmente no que concerne a utilização de uma instrumentação simples, economia no consumo de reagentes e velocidade de processamento. O método FIA apresenta grandes vantagens principalmente em análises de rotina devido a sua alta versatilidade e alto grau de repetibilidade e segurança, curto tempo de reação e, finalmente de fácil automação (MIKUSKA & VECERA, 2003). Deste modo, um significativo número de métodos propostos para determinação simultânea de nitrato e nitrito empregam o sistema FIA (AHMED et al., 1996; GABRIEL et al., 1998; ZHI-QI et al, 1998; KAZEMZADEH & ENSAFI, 2001; HAGHIGHI & TAVASSOLI, 2002, YUE et al. 2004).

ANDRADE et al. (2003), relataram metodologia analítica para a determinação de nitrato, utilizando análise por injeção em fluxo (FIA), eliminando o uso de aminas aromáticas. O método baseia-se na determinação do nitrato e nitrito através de um complexo ternário formado a partir de NO, ferro (II) e tiocianato, em meio ácido. O complexo  $\text{FeSCNNO}^+$  absorve na região do visível do espectro eletromagnético (460 nm), sendo que a absorbância é proporcional a concentração de nitrato e nitrito.

Nitrato, ou a soma de nitrato mais nitrito, têm sido determinadas pelas mesmas reações após a redução do nitrato a nitrito. Redução pelo cádmio é usualmente proposto devido sua alta eficiência (CARRER et al., 1995;

GUERRERO et al., 1996) e por poder ser usado continuamente por um período relativamente longo (McKELVIE et al., 1994), assim como o cádmio cuperizado (VAN STANDEN, 1982). Outros reagentes para a redução do nitrato têm sido utilizadas, tais como, hidrazina sulfato (JOHNES & HEATHWAIT, 1992; CERDÁ et al., 1996; CERDÁ et al., 1997), redução fotoquímica (MOTOMIZU & SANADA, 1995; CALATAYUD et al., 1998) e reação enzimática (BORIES & BORIES, 1995).

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A mamadeira preparada com fórmula infantil para lactentes constitui a principal fonte de exposição ao nitrato em lactentes menores de três meses de idade que não estejam sujeitos a amamentação. Em geral, é recomendado que a avaliação periódica dos teores de nitrato e nitrito em alimentos deva ser realizada para que a IDA não seja ultrapassada a fim de não causar riscos à saúde da população. A toxicidade do nitrato está relacionada com sua redução a nitrito, sendo que os principais efeitos tóxicos associados à exposição a esse íon são hipertrofia da zona adrenal glomerulosa em ratos, metemoglobinemia, mais relevante em humanos, principalmente em crianças, e formação de compostos N-nitrosos, os quais são substâncias potencialmente carcinogênicas.

Há a necessidade de estabelecer legislação específica para a presença de nitrato em fórmulas infantil para lactentes, principalmente para aqueles produtos que se destinam a crianças menores de três meses de idade.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.R.; COSTA, L.C.G.; FURTADO, M.M. Influência da adição de nitrato de sódio ao leite destinado à fabricação de queijo “prato”, nos teores de  $\text{NO}_3$  e  $\text{NO}_2$  do soro e do queijo. *Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes*, 41, 247, 35-36, 1986.

AHMED, M.J.; STALIKAS, C.D.; TZOUWARA-KARAYANNI, S.M.; KARAYANNIS, M.I. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow-injection analysis. *Talanta*, 43, 1009-1019, 1996.

ANDRADE, R.; VIANA, C.O.; GUANAGNIN, S.G.; REYES, F.G.R.; RATH, S. A flow-injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide geration. *Food Chemistry*, 80, 597-602, 2003.

AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists: agriculture chemical contaminants' drugs. Method 976.14 (15th ed.) Washington, D.C., v.1, 1990.

AOKI, T.; FUKUDA, S.; HOSOI, Y., MUKAI, H. Rapid flow injection analysis method for successive determination of ammonia, nitrite, and nitrate in water by gás-phase chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta*, 349, 11-16, 1997.

ARAÚJO, A.C.P.; MÍDIO, A.F. Nitratos y nitritos em alimentos infantilis industrializados y caseros. *Alimentaria*, Madrid, 27 (209), 69-75, 1990.

BARTHOLOMEW, B.; HILL, M.J. The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Food and Chemistry Toxicology*, 22, 789-795, 1984.

BARTSCH, H.; MONTESANO, R. Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis*, 5, 1381-1393, 1984.

BISWAS, S.; CHOWDHURY, B.; RAY, B.C. A novel spectrofluometric method for the ultra trace analysis of nitrite and nitrate in aqueous medium and its application



to air, water, soil and forensic samples. *Talanta*, India, 64, 308-312, 2004.

BORIES, P.N. & BORIES, C. Nitrate determination in biological-fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clinical Chemistry*, 41, 904-907, 1995.

BORONAT, M.D.C.T.; PADROS, R.B.; ALONSO, M.I. Nitratos y nitritos en la alimentacion infantil: riesgos de su ingesta. *Alimentaria*, 138, 31-35, 1982.

BRASIL. Decreto nº 30691, art. 542, do Ministério da Saúde da Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS/MS. *Diário Oficial da União*, 07 de julho 1952. Disponível em (<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>). Acesso em 03/03/04.

BRASIL. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento técnico da identidade dos queijos. *Diário Oficial da União*. Brasília DF, 11mar. 1996. Disponível em (<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>). Acesso em 13/05/04.

BRASIL. Resolução nº 34/1998, art.4º, do Ministério da Saúde da Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS/MS. *Diário Oficial da União*, 13 jan. 1998. Disponível em (<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>). Acesso em 13/05/04.

BRASIL. Portaria MS nº 1.469, 29 de dezembro de 2000. Regulamento técnico na Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano. *Diário Oficial da União*, Brasília DF, 2 Jan. 2001. Disponível em (<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>). Acesso em 05/02/04.

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

BULDT, A.; KARST, U. Determination of nitrite in waters by microplate fluorescence spectroscopy and HPLC with fluorescence detection. *Analytical Chemistry* 71, 3003-3007, 1999.

CALATAYUD, J.M.; HATEO, J.V.G.; DAVID, V. Serum progesterone and milk production and composition in dairy cows fed two concentrations of nitrate. *Analyst*, 123, 429-434, 1998.

CARPENTER, N.G.; PLETCHER, D. Amperometric method for determination of nitrate in water. *Analytica Chimica Acta*, 317, 287-293, 1995.

CARRER, I.; CUSMAI, P.; ZANOZOTTERA, E.; MARTINOTTI, W.; REALINI, F. Application of photoacoustic spectrometry to flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 308, 20-27, 1995.

CERDÁ, A.; OMS, M.T.; FORTEZA, R. CERDÁ, V. Spectation of nitrogen in wastewater by flow injection. *Analyst*, 121, 13-17, 1996.

CERDÁ, A.; OMS, M.T.; FORTEZA, R. CERDÁ, V. Total nitrogen determination by flow injection using on-line microwave-assisted digestion. *Analytica Chimica Acta*, 351, 273, 1997.

CORTAS, N.K.; WAKID, N.W. Pharmacokinetics aspects of inorganic nitrate ingestion in man. *Pharmacology and Toxicology*, 68, 192-193, 1991.

De WIT, J.N. The use of whey protein products. *Developments in Dairy Chemistry* – 4, Fox, P.F. (Ed.), New York. Elsevier Applied Science, 1989, 323-345.

DONELLY, L.S.; BUSTA, F.F. Anaerobic sporeforming microorganism in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 64, 1, 161-166, 1981.

DUARTE M.; MIDIO, A.F. Nitratos e nitritos em alimentos. *Cadernos de nutrição*, 12, 19-30, 1996.

DUARTE, M.; RIBEIRO, A.; MIDIO, A.F. Contenido de nitrato em distintas variedades de leche comercializadas em países del mercosur. *Alimentaria*, 19-21, 1997.

DUARTE M.; MIDIO, A.F. Sorolácteo: características nutricionais e riscos na sua utilização. *Higiene Alimentar*, 11(47), 23-25, 1997 a.

ECHANIZ, J.S.; FERNANDEZ, J.B.; RASO, S.M. Methemoglobinemia and Consumption of Vegetables in Infantis. *Pediatrics*, 107 (5), 2001.

ENSAFI, A.A; KAZEMZADEH, A. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow injection with spectrophotometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 382, 15-21, 1999.

FERNÍCOLA, N.A.G.G. Metahemoglobina infantil causada por nitratos. *Boletim Oficial Sanitary Panamericana*, 106, 32-39, 1989.

FERREIRA, S.M.R.; CAMARGO, L. Aditivos em alimentos. *Boletim CEPPA*, 11,160-176, 1993.

FURTADO, M.M. O estufamento tardio dos queijos: características e prevenção – uma revisão. *Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes*, 40 (242), 3-39, 1985.

GABRIEL, D.; BAEZA, J.; VALERO, F.; LAFUENTE, J. A novel FIA configuration for the simultaneous determination of nitrate and nitrite and its use for monitoring an urban waste treatment plant based on N/D criteria. *Analytica Chimica Acta*, 359, 173-183, 1998.

GANGOLLI, S.D.; van den BRANDT, P.A.; FERON, V.J.; JANZOWSKY, C.; KOEMAN, J.H.; SPEIJERS, G.J.A.; SPIEGELHALDER, B.; WALKER, R.; WISHNOK, J.S. Nitrate, Nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of pharmacology Environmental of toxicology and pharmacology*. Section 292, 1-38, 1994.

GENTO, P.D. Acumulation de ion nitrate en lechugas cultivadas mediante abonado orgánico. *Alimentaria*, 251, 79-80, 1994<sup>a</sup>.

GENTO, P.D. Contenido de nitratos em vegetales cultivados de la provincia de Valencia. *Alimentaria*, 249, 49-51, 1994<sup>b</sup>.

GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. *Food Technology*, 48 (10), 50-60, 1994.

GINÉ, M.F.; BERGAMIN F°, H.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F. Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 114, 191-197, 1980.

GRAY, J.I.; IRVINE, D.M.; KADUDA, Y. Nitrates and N-nitrosamines in cheese. *Journal of Food Protein*, 42, 263-272, 1979.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; FOX, J.G. Nitrate in human and canine milk, *Journal of Medicine*, 306, 1367-1368, 1982.

GUERRERO, R.S.; BENITO, C.G.; CALATAYUD, J.M. Flow-injection analysis-spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in water samples by reaction with proflavin. *Talanta*, 43, 239, 1996.

HAGHIGHI, B.; TAVASSOLI, A. Flow injection analysis of nitrite by gas phase molecular absorption UV spectrophotometry. *Talanta*, 56 (1), 137-144, 2002.

HEGESH, E.; SHILOAH, J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clinica Chimica Acta*, 125, 107-115, 1982.

HUFFMAN, L.M. Processing whey protein for use as a food ingredient. *Food Technology*, 41(10), 72-103, 1996.

JAFFÉ, E.E. Methaemoglobinaemia. *Clinical Haematology*, 10, 99-122, 1981.

JOHNES, P.J.; HEATHWAITE, A.L., A procedure for the simultaneous determination of total nitrogen and total phosphorus in freshwater sample using persulphate microwave digestion. *Water Research*, 26, 1281-1287, 1992.

KAZEMZADEH, A.; ENSAFI, A.A. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow-injection spectrophotometric detection. *Microchemical Journal*, 69, 159-166, 2001.

KIM, H.J.; CHANG, W.K.; KIM, M.K.; LEE, S.S.; CHOI, B.I. Dietary Factors and Gastric Cancer in Korea: A Case-Control Study. *International Journal of Cancer*, 97, 531-535, 2002.

KNOBELOCK, L.; SALNA, B.; HOGAN, A.; POSTLE, J.; ANDERSON, H. Blue Babies and nitrate-contaminated well water. *Environmental Health Perspectives*, 108 (7), 2000.

KROSS, B.C.; AYEBO, A.D.; FUORTES, L.J. Methaemoglobinaemia: nitrate toxicity in rural America. *American Family Physician*, 46, 183-188, 1992.

KYRIAKIDIS, N.B.; TARANTILI-GEORGIOUS, K.; TSANI-BATZAKA, E. Nitrate and nitrite content of greek cheeses. *Journal of Compositions and Analysis*, 10. 343-349, 1997.

LI, H.; MEININGER, C.J.; WU, G.Y. Rapid determination of nitrite by reversed-phase HPLC with fluorescence detection. *Journal Chromatography B*, 746, 199-207, 2000.

MAFF (Ministry of agriculture, Fisheries and Food, Great Britain). Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in food. *Food Surveillance Paper* n°20, 1987.

MAFF (Ministry of agriculture, Fisheries and Food, Great Britain). Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in food. Second Report, *Food Surveillance Paper* n°32, 1992.

McKELVIE, I.D.; MITRI, M.; HART, B.T.; HAMILTON, I.C.; STUART, D. Analysis of total dissolved nitrogen in natural waters by on-line photooxidation and flow injection. *Analitica Chimica Acta*, 293, 155-162, 1994.

McKNIGHT, G.M.; SMITH, L.M.; DRUMMOND, R.S.; DUNACN, C.W.; GOLDEN, M.; BENJAMIN, N. Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut*, 40, 211-214, 1997.

McKNIGHT, G.M.; DUNCAN, C.W.; LEIFERT, C.; GOLDEN, M.H. Dietary nitrate in man: friend or foe? *British Journal of Nutrition*, 81, 349-358, 1999.

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

MITACEK, E.J.; BRUNNEMANN, K.D.; SUTTAJIT, M.; MARTIN, N.; LIMSILA, T.; OHSHIMA, H.; CAPLAN, L.S. Exposure to N-nitroso compounds in a population of high liver cancer regions in Thailand: Volatile nitrosamine (VNA) levels in Thai food. *Food and Chemistry Toxicology*, 37, 297-305, 1999.

MIYADO, T.; NAGAI, H.; TAKEDA, S.; SAITO, K.; FUKUSHI, K. YOSHIDA, Y.; WAKIDA, S.; NIKI, E. Development of a novel running buffer for the simultaneous determination of nitrate and nitrite in human serum by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1014 (1-2), 197-202, 2003.

MIRVISH, S.S. Formation of nitroso compounds: chemistry, kinetics and *in vivo* occurrence. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 31, 325-351, 1975.

MONSER, L.; SADOK, S.; GREENWAY, G.M.; SHAH, I.; UGLOW, R. F. A simple simultaneous flow injection analysis for chlorination of water and wastewater. *Water Research*, 57 (3), 511-518, 2002.

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

MORR, C.V. Whey proteins: manufacture. *Developments in dairy chemistry – 4*. Fox, P.F. (Ed), New York.. Elsevier Applied Science, 1989, 245-283.

MOTOMIZU, S. & SANADA, M. Photo induced reduction of nitrate to nitrite and its application to the sensitive determination of nitrate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 308, 406-412, 1995.

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

NEVES, B.S. Elaboração de bebidas lácteas a base de soro. *Leite & Derivados*, 2(10), 50-54, 1993.

NILSSON, A.; ENGBERG, G.; HENNEBERG, S. Inverse relationship between age-dependent erythrocyte activity of methaemoglobin reductase and prilocaine-induced methaemoglobinaemia during infancy. *British Journal Anaesthesiology*. 64, 72-76, 1990.

OLIVEIRA, C.P. & GLÓRIA M.B.A. Teores de nitratos e nitritos em alimentos infantis industrializados contendo soro de leite. *Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes*, 48(287), 21-26, 1993.

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

PENNA, A.L.B.; OLIVEIRA, M.N.; BARUFFALDI, R. Análise de consistência de iogurte: correlação entre medida sensorial e instrumental. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 17(2), 98-101, 1997.

PENNINGTON, J.A.T. Dietary exposure models for nitrates and nitrites. *Food Control*, 9(6), 385-395, 1998.

PÉREZ-OLMOS, R.; RIOS, A.; FÉRNANDEZ, J.R.; LAPA, R.A.S.; LIMA, J.L.F.C. Construction and evaluation of ion selective electrodes for nitrate with a summing

operational amplifier. Application to tobacco analysis. *Talanta*, 53 (4), 741-748, 2001.

PETERSEN, A.; STOLTZE, S. Nitrate and nitrite in vegetables on the Danish market content and intake. *Food Additives and Contaminants*, 16, 291-299, 1999.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; CASTRO-GOMEZ, R.J.H. Soro de leite – obtenção, características e aproveitamento: revisão. *Semina Ciência Agronômica*, 13 (1), 92-96, 1992.

ROCHE, M.O.G.; MELIAN, M.G.; PEREZ, R.C. Nitratos, nitritos y compuestos N-nitroso. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS, Metepec, Estado de México, México, Serie Vigilancia, 13, 1994.

SARASUA, S.; SAVITZ, D.A. Cured and broiled meat consumption in relation childhood cancer. *Cancer Causes Control*, 5, 141-148, 1994.

SGARBIERI, V.C. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações*. 1º Ed. Varela, São Paulo, 1996, p.517.

SILVA, M.; GALLEGO, M.; VALCÁRCEL, M. Sequential atomic absorption spectrometric determination of nitrate and nitrite in meats by liquid-liquid extraction in a flow-injection system. *Analytica Chimica Acta*, 179, 341-349, 1986.

SPIEGELHALDER, B.; EISENBRAND, G.; PREUSSMANN, R. Influence of dietary nitrate on nitrite content human saliva: possible relevance to *in vivo* formation of N-nitroso compounds. *Food and Cosmetics Toxicology*, 14, 545-548, 1976.

STEFANI, E.; BOFFETTA, P.; MENDILAHARSU, M.; CARZOGLIO, J.; PELLEGRINI, H.D. Dietary nitrosamines, heterocyclic amines, and risk of gastric cancer: A case-control study in Uruguay. *Nutrition and Cancer*, 30, 158-162, 1998.

SUKEGAWA, K.; MATSUMOTO, T. Nitrate and nitrite contents in cow and human milk, *Eiyō To Shokuryō*, 28, 389-393, 1975.



SWANN, P.F. The toxicology of nitrate, Nitrite and N-nitroso Compounds. *Journal of Chromatography A*, 508, 357-362, 1990.

TANNENBAUM, S.R.; FETT, D., YOUNG, V.R.; LAND, P.D., BRUCE, W.R. Nitrite and nitrate are formed by endogeneous syntesis in the human intestine. *Science*, 200, 1487-1489, 1978.

TERRY, P.; TERRY, J.B., WOLK, A. Fruit and vegetable consumption in the prevention of cancer: an update. *Journal of Internal Medicine*, 250, 280-290, 2001.

TOTAPALLY, B.R.; NOLAN, B.; ZUREIKAT, G.; INOUE, S. An usual case of methemoglobinemia in infancy, *American Journal of Emergency Medicine*, 16(7), 723-724, 1998.

TRICKER, A.R.; PREUSSMANN R. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanism and carcinogenic potential. *Mutation Research*, 259, 277-289, 1991.

TUREK, B.; HLAVSOVA, D.; TUREK, J.; WALDMAN, J.; CERRA, J. The fate of nitrates of nitrites in the organism. *International Agency for Research of Cancer Science Public*, 31, 625-632, 1980.

USHER, C.D.; TELLING, G.M. Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2, 1793-1805, 1975.

VAN STADEN, J.F. Automated simultaneous determination of nitrate and nitrite by pre-valve reduction of nitrate in a flow-injection system. *Analytica Chimica Acta*, 138, 403-408, 1982.

VITTOZZI, L. Toxicology of nitrates and nitrites. *Food Additives and Contaminants*, 9, 579-585, 1992.

WALKER, R. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Additives and*

*Contaminants*, 7, 717-768, 1990.

WALKER, R. The metabolism of dietary nitrites and nitrates. *Biochemical Society Transactions*, 24, 780-785, 1996.

WALTERS, C.L.; SMITH, P.L.R. The effect of water-borne nitrate on salivary nitrite. *Food and Chemical Toxicology*, 19, 297-302, 1981.

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

WANG, H.; YANG, W.; LIANG, SHU-CAI; ZHANG, ZHI-MIN; ZHANG, HUA-SHAN. Spectrophotometric determination of nitrite with 5,6-diamino-1,3-naphthalene disulfonic acid. *Analytica Chimica Acta*, 419 (2), 169-173, 2000.

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

WHO. Food Additives Series No 50. Safety Evaluation of Certain Food Additives. Fifty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva, 2003.

WU, Y.; CHEN, J.; OHSHIMA, H.; PIGNATELLI, B.; BOREHAM, J.; LI, J.; CAMPBELL, T.C.; PETO, R.; BARTSCH, H. Geographic Association between urinary excretion of N-nitroso compounds and oesophageal cancer mortality in china. *International Journal of Cancer*, 54, 713-719, 1993.

XIMENES, M.I.N.; RATH, S.; REYES, F.G.R. Polarographic determination of nitrate in vegetables. *Talanta*, 51, 49-56, 2000.

YSART, G.; MILLER, P.; BARRETT, G.; FARRINGTON, D.; LAWRENCE, P.; HARRISON, N. Dietary exposures to nitrate in the UK. *Food Additives Contaminants*, 16, 521-532, 1999.

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

ZATAR, N.A.; ABU-EID, M.A.; EID, A.F. Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate using phosphomolybdenum blue complex. *Talanta*, 50, 819-826, 1999.

ZHI-QI, Z.; LOU-JUN, G.; HAN-YING, Z.; QIAN-GUANG, L. Catalytic simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate with a flow injection system. *Analytica Chimica Acta*, 370, 59-63, 1998.

## **CAPÍTULO 2**

### **DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITRATO EM FÓRMULAS INFANTIS POR SISTEMA FIA E ESTIMATIVA DA SUA EXPOSIÇÃO EM LACTENTES**

Este trabalho será submetido para a publicação no periódico Food Additives and Contaminants

## DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITRATO EM FÓRMULAS INFANTIS POR SISTEMA FIA E ESTIMATIVA DA SUA EXPOSIÇÃO EM LACTENTES

### RESUMO

No presente trabalho foi validado um método para a determinação de nitrato utilizando análise por injeção em fluxo (FIA), com determinação espectrofotométrica através da formação do complexo  $\text{FeSCNNO}^+$ . Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros: faixa linear (0,50 – 3,00 mg L<sup>-1</sup>), linearidade 0,997, repetibilidade intra-ensaio (RSD 1,60%; n=10), limite de detecção (0,3 mg kg<sup>-1</sup>), limite de quantificação (1,00 mg kg<sup>-1</sup>) e exatidão (94 a 108%). O método foi utilizado para a determinação de nitrato em fórmula infantil para lactentes em amostras disponíveis no estado de São Paulo. Os teores de nitrato nas amostras analisadas (n=30) foram menores do que 21,8 mg kg<sup>-1</sup>, sendo que 09 amostras apresentaram níveis abaixo do limite de quantificação do método e 21 apresentaram um valor médio de  $7,0 \pm 0,35$  mg kg<sup>-1</sup>. Estimou-se a ingestão diária de nitrato através do consumo das mamadeiras preparadas com a fórmula infantil, na faixa etária de 0 a 12 meses. A estimativa da ingestão de nitrato pelo lactente foi obtida considerando-se a fórmula infantil e a água utilizada no preparo das mamadeiras, e variou entre 0,37 a 2,69 mg/kg pc/dia. Cabe destacar que os maiores valores de ingestão foram verificados nos lactentes menores de três meses de idade. Os resultados obtidos indicam a necessidade de estabelecer legislação específica para a presença de nitrato nas fórmulas infantis, em particular naquelas destinadas a lactentes de até 12 semanas de vida, para assim poder-se realizar ações visando o controle da presença de nitrato nessa matriz, visto que lactentes até o terceiro mês de vida são particularmente susceptíveis a formação de metemoglobina devido à exposição ao nitrato.

Palavras chaves: fórmula infantil, nitrato, análise por injeção em fluxo (FIA).

## EVALUTION OF THE NITRATE IN INFANT FORMULA TO INFANTS BY FLOW INJECTION ANALYSIS (FIA)

### SUMMARY

In the present work it was validated a method to quantify nitrate using flow injection analysis (FIA), with spectrophotometric determination based on the formation of  $\text{FeSCNNO}^+$ . For this purpose the following parameters were evaluated: linear range ( $0,50 - 3,00 \text{ mg L}^{-1}$ ), linearity 0.9917; intra-assay accuracy (RSD 1.60%;  $n=10$ ), detection limit ( $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ), quantification limit ( $1,00 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and recovery (94 to 108%). The method was used for the determination of nitrate in infant formulas available in the retail market of the state of São Paulo. The nitrate level in the samples ( $n=30$ ) was lower than  $21.8 \text{ mg kg}^{-1}$ , in this regard 09 samples presented a nitrate level lower than the determination limit of the method and 21 showed medium value of  $7.0 \pm 0.35 \text{ mg kg}^{-1}$ . The daily nitrate intake was estimated considering the average consumption of baby bottles prepared with the infant formula, for children aging 0 – 12 months old. An estimation of the daily nitrate of nitrate by the infants was obtained considering the infant formula and the water used in the preparation of the baby bottles, and ranged from 0.37 to  $2.69 \text{ mg/kg pc/day}$ . It should be emphasized that the higher values of ingestion were found for infants less than three months old. The results indicate the need to establish specific legislation for the presence of nitrate in infant formulas, in particular for those destined to infants up to 12 weeks old, in order to be able to conduct actions to control the presence of nitrate in this matrix, since infants since the third month of life are particularly susceptible to the formation of methemoglobin due to nitrate exposure.

Keywords: infant formula, nitrate, flow injection analysis (FIA).

## 1. INTRODUÇÃO

Os sais de nitrato e nitrito estão naturalmente presentes em alimentos de origem vegetal, animal e na água, sendo utilizados como aditivos alimentares por possuírem propriedades antioxidantes e bacteriostáticas que impedem o crescimento de microrganismos causadores do botulismo, principalmente de *Clostridium botulinum* em carnes curadas e *Clostridium tyrobutiricum* em queijos (ARAUJO & MÍDIO, 1990; FERREIRA & CAMARGO, 1993; DUARTE & MIDIO, 1997).

O íon nitrato é considerado de baixa toxicidade, mas quando reduzido a nitrito pode representar um alto risco à saúde. O nitrito pode interagir com a hemoglobina afetando o transporte de oxigênio levando a metemoglobinemia e também pode reagir com aminas secundárias e terciárias formando compostos N-nitrosos os quais são potencialmente carcinogênicos (WALKER, 1990). Para crianças com idade inferior a três meses os nitratos representam um risco adicional, pelo fato de possuírem um pH mais elevado na mucosa duodenal o que permite o crescimento de bactérias capazes de transformar o nitrato em nitrito (KROSS et al., 1992). Cabe destacar que nessa faixa etária a mamadeira preparada com a fórmula infantil representa a principal fonte de exposição ao nitrato.

O Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) estabeleceu em sua 59ª reunião uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) para nitrato de 0 – 3,7 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo e de 0 – 0,07 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo para nitrito (WHO, 2003), ressaltando que a IDA não deve ser aplicada às crianças menores de três meses de idade (WHO, 1996).

Várias metodologias têm sido propostas para a determinação quantitativa de nitrato e nitrito, incluindo métodos cinéticos (LIANG et al., 1994), cromatográficos (SIU & HENSHALL, 1998; BUTT, et al., 2001), potenciométricos (LI et al., 2000; SCHALLER et al., 1994), amperométricos (BERTOTTI & PLETCHER, 1997), voltamétricos (XIMENES et al., 2000), eletroforese capilar (ÖZTEKIN et al.; 2002) e espectrofotométricos (KAWAKAMI & IGRASHI, 1996;

AOAC, 1997). No entanto, o método mais empregado é o recomendado pela AOAC (1997), que envolve a redução do nitrato a nitrito em coluna de cádmio esponjoso e posterior determinação por espectrofotometria, na região visível, do azo composto formado mediante reação do nitrito com ácido sulfanílico e N-1-naftil etilenodiamina (Reação de Griess). As desvantagens dessa metodologia são: emprego de substâncias potencialmente carcinogênicas, elevado consumo de reagentes e baixa frequência de amostragem (ANDRADE et al., 2003).

Cabe ressaltar que o Brasil não dispõe de legislação específica para limites do teor de nitrato em fórmula infantil para lactentes.

Em vista dos problemas que o nitrato pode causar à saúde se consumido em excesso, em particular por lactentes menores de três meses de idade, o objetivo do presente trabalho foi o de validar metodologia analítica para a determinação de nitrato em fórmula infantil para lactentes, utilizando análise por injeção em fluxo (FIA). O método foi utilizado para analisar amostras de fórmula infantil para lactentes disponíveis no mercado, com o intuito estimar a exposição ao nitrato em lactentes.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Reagentes**

Os reagentes utilizados para a determinação de nitrato foram:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  95% (Merck, Alemanha),  $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  98,5% (Merck, Alemanha), KSCN 99% (Merck, Alemanha),  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  99,5% (Carlo Erba, Itália),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  99,8% (Vetec, Brasil) e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  99,5% (Synth, Brasil). O padrão analítico de  $\text{NaNO}_3$  foi adquirido da Merck (Alemanha) apresentando pureza de 99%.



## 2.2. Amostras

Foram analisadas 15 tipos diferentes das marcas disponíveis, no Estado de São Paulo, de fórmula infantil para lactentes (0 a 1 ano de idade). Para cada tipo foram analisados dois lotes distintos. Todas as amostras foram adquiridas em supermercados, no ano de 2004.

## 2.3. Preparo das Soluções

- *Solução tampão concentrada*

Para o preparo da solução de tampão concentrada, 100 g de cloreto de amônio, 20 g de tetraborato de sódio e 1,0 g de etilenodiaminatetracetato dissódico foram dissolvidos em um balão de 1000 mL com água destilada.

- *Solução tampão diluído (Solução Básica – R1)*

O tampão diluído foi preparado dissolvendo-se 2,5 mL do tampão concentrado em um balão volumétrico de 250 mL em água destilada. O pH dessa solução resultante foi ajustado para 8,5 com solução de hidróxido de sódio 1,0 mol L<sup>-1</sup> com a utilização de um pHmêtro (Digimed DM-20).

- *Solução de sulfato ferroso amoniacal concentrado*

A solução de sulfato ferroso amoniacal concentrado foi preparada transferindo-se 0,278 g de sulfato ferroso amoniacal a balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com ácido sulfúrico 1,0 mol L<sup>-1</sup>.

- *Solução de sulfato ferroso amoniacal diluído (R2)*

Da solução de sulfato ferroso amoniacal concentrado, 15 mL foram transferidos a um balão volumétrico de 250 mL sendo o volume completado com água destilada para o preparo da solução de ferro diluído.

- *Solução de tiocianato de potássio 0,4 mol L<sup>-1</sup> (R3)*

A solução de tiocianato de potássio 0,4 mol L<sup>-1</sup> foi preparada dissolvendo-se 9,718 g de tiocianato de potássio em um balão volumétrico de 250 mL com água destilada.

- *Solução padrão estoque de nitrato 100 mg L<sup>-1</sup>*

A solução estoque de nitrato 100 mg L<sup>-1</sup> foi preparada dissolvendo-se 0,137 g de nitrato, previamente seco em estufa a 110°C por duas horas, em balão volumétrico de 1000 mL com água destilada.

- *Solução padrão de trabalho de nitrato*

A partir da solução padrão estoque de nitrato 100 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas diariamente, com água desionizada, soluções de nitrato de concentrações de: 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50 e 3,00 mg L<sup>-1</sup>.

- *Sulfato de Zinco 1,00 mol L<sup>-1</sup>*

A solução de sulfato de zinco 1,00 mol L<sup>-1</sup> foi preparada transferindo-se 28,75 g de sulfato de zinco a um balão volumétrico de 100 mL sendo o seu volume completado com água destilada.

- *Solução de hexacianoferrato de potássio 0,35 mol L<sup>-1</sup>*

A solução de ferrocianeto de potássio 0,35 mol L<sup>-1</sup> foi preparada dissolvendo-se 14,80 g de ferrocianeto de potássio hexahidratado em um balão volumétrico de 100 mL com água destilada.

- *Solução de sulfato de cádmio 20 % (m/v).*

A solução de sulfato de cádmio 20 % (m/v) foi preparada transferindo-se 20 g de sulfato de cádmio a um balão volumétrico de 100 mL e completando-se o volume com água destilada.

- *Solução de sulfato de cobre 2 % (m/v) e EDTA 0,1 mol L<sup>-1</sup>*

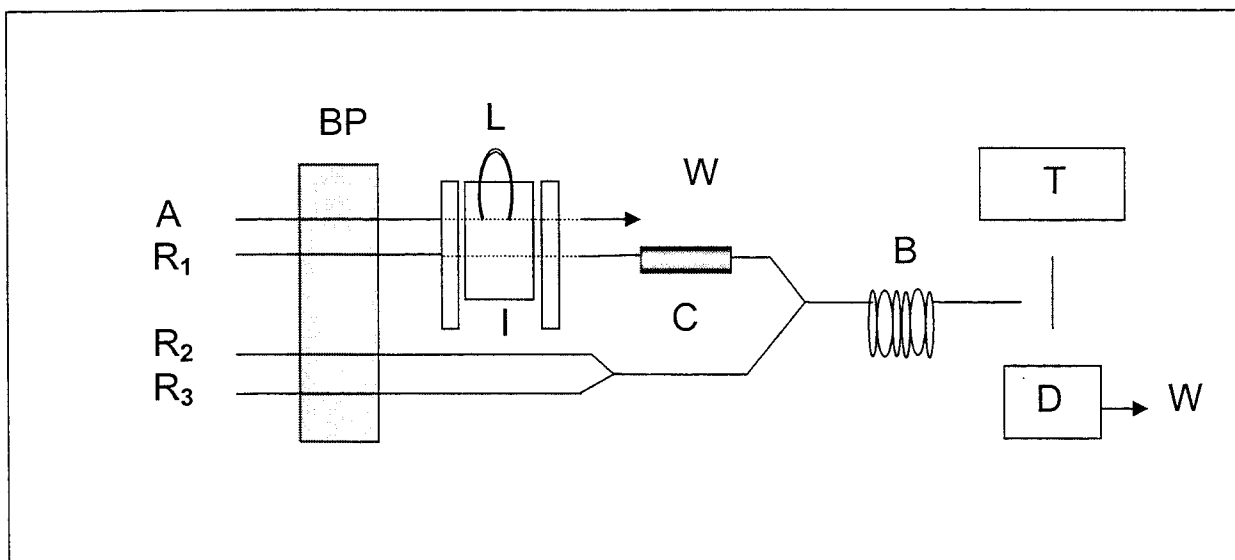
A solução de sulfato de cobre 2 % (m/v) e EDTA 0,10 mol L<sup>-1</sup> foi preparada transferindo-se 3,722 g de EDTA e 2,0 g de sulfato de cobre a um balão volumétrico de 100 mL e completando-se o volume com água destilada.

## 2.4. Sistema FIA

### 2.4.1. Otimização do sistema FIA na determinação de nitrato

O sistema FIA usado foi constituído de: bomba peristáltica de quatro canais (Ismatec, Suíça), tubos de tygon com 1,2 mm de diâmetro interno (d.i.), injetor proporcional de duas seções de comutação construído em acrílico, tubos de polietileno com diâmetro de 1,2 mm, espectrofotômetro modelo 432 (Femto, Brasil), provido de cela de fluxo de vidro, com 10 mm de caminho ótico e integrador (Waters – 746 Data Module).

O diagrama do sistema FIA empregado para a determinação de nitrato está apresentado na **Figura 1**.



**Figura 1.** Sistema FIA para determinação de nitrato. A: amostra; R<sub>1</sub>: NH<sub>4</sub>Cl + Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> + Na<sub>2</sub>EDTA, 0,01% v/v, pH 8,5 (1,2 mL min<sup>-1</sup>); R<sub>2</sub>: 6.10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> em 6.10 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,2 mL min<sup>-1</sup>); R<sub>3</sub>: 0,4 mol L<sup>-1</sup> de SCN<sup>-</sup> (1,2 mL min<sup>-1</sup>); BP: bomba peristáltica; I: injetor proporcional; L: alça de amostragem (300 µL); C: coluna de vidro com cádmio cuperizado (75 mm x 3 mm); B: bobina de reação (100 cm); D: detector (λ 460 nm); T: integrador e W: descarte.

#### 2.4.2. Preparo da coluna de cádmio cuperizado

O cádmio esponjoso utilizado no preparo da coluna foi obtido conforme recomendado na literatura (LARA et al., 1978), sendo cuperizado com uma solução contendo 0,1% (m/v) de sulfato de cobre em 0,10 mol L<sup>-1</sup> EDTA (VAN STADEN, 1982). Bastões de zinco foram colocados em uma proveta contendo 50 mL de solução de sulfato de cádmio 20 % (m/v). O cádmio esponjoso formado ao redor do bastão foi recolhido, triturado em liquidificador por aproximadamente 2 a 3 segundos. O cádmio triturado, ainda em água destilada, foi passado por uma peneira de 40 mesh, em seguida foi lavado com adições sucessivas de água destilada até pH neutro e logo após com solução de sulfato de cobre 2 % e EDTA 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Em uma coluna de vidro de aproximadamente 7,5 cm de comprimento foi colocada uma pequena quantidade de lã de vidro em uma das extremidades e, com a ajuda de uma espátula e de água destilada, o cádmio cuperizado foi transferido até completo preenchimento. Finalizou-se acrescentando lã de vidro a outra extremidade e conectando-se tubos para que fosse utilizada no sistema FIA.

#### 2.4.3. Ativação da coluna

Antes da determinação de nitrato, a coluna foi ativada mediante passagem de 100 mL da solução R<sub>1</sub>, 50 mL da solução de nitrato 100 mg L<sup>-1</sup> em uma vazão de 1,4 mL min<sup>-1</sup> (GABRIEL et al., 1998).

#### 2.4.4. Regeneração da coluna

A reativação da coluna de cádmio foi realizada quando o sinal analítico (absorvância) diminuía cerca de 5%, passando sucessivamente uma solução de ácido clorídrico 0,10 mol L<sup>-1</sup> por 5 minutos, água desionizada por 5 minutos para lavagem e solução básica (R<sub>1</sub>) durante 5 minutos.

## 2.5. Preparo das amostras

Foram pesadas 5,0 g da fórmula infantil para lactentes (triplicata), e acondicionadas em tubo de ensaio para a realização das análises.

### 2.5.1. Extração do nitrato da matriz e clarificação do extrato

A extração do nitrato da matriz foi realizada em meio aquoso a 50°C. A 5,0g da amostra pesada em tubo de ensaio foram adicionados 20 mL de água desionizada a 50 °C. A amostra liquefeita foi transferida para balão volumétrico de 50 mL. Em seguida foram adicionados 3,5 mL sulfato de zinco 1 mol L<sup>-1</sup> e 3,5 mL hexacianoferrato de potássio 0,35 mol L<sup>-1</sup> (reagente de Carrez) com agitação após adição de cada reagente e deixado em repouso por trinta minutos para a clarificação do extrato, conforme descrito na literatura (AOAC, 1997). Decorrido este tempo, foi completado o volume final de 50 mL com água desionizada e a solução foi filtrada com papel de filtro qualitativo Whatman nº 4. O filtrado foi levado à centrifugação por 10 minutos a 3.000 RPM. O sobrenadante foi percolado em cartucho de extração em fase sólida (C<sub>18</sub>), para a obtenção de melhor clarificação do extrato final. O condicionamento do cartucho foi realizado pela passagem de metanol (7,5 mL) e água desionizada (7,5 mL).

### 2.5.2. Determinação do nitrato por sistema FIA

O extrato obtido em 2.5.1 foi analisado por FIA, empregando o sistema apresentado na Figura 1 (2.4). As condições empregadas foram: concentrações de Fé (II) e SCN<sup>-</sup> 6,0 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,060 mol L<sup>-1</sup> e 0,40 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. A vazão dos reagentes foi de 1,4 mL min<sup>-1</sup>, o tamanho da bobina de reação foi de 100 cm e o volume da alça de amostragem foi de 300 µl.

A quantificação foi realizada por calibração externa. Para tanto, foi construída uma curva analítica para nitrato, na faixa de concentração de 0,50 a 3,0 mg L<sup>-1</sup>.

### 3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Para garantir a confiabilidade do método analítico proposto para quantificar o nitrato em fórmula infantil para lactentes foram avaliados os seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, repetibilidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), recuperação. Os limites de detecção e de quantificação foram calculados a partir da curva analítica (MILLER & MILLER, 1993), os demais parâmetros foram avaliados segundo SHABIR, 1998.

Faixa linear: foram construídas curvas analíticas para o nitrato no intervalo de concentração de 0,50 a 3,0 mg L<sup>-1</sup>.

Linearidade (r): calculadas a partir da regressão linear de cinco curvas analíticas obtidas em um mesmo dia, empregando soluções padrão de nitrato no intervalo de concentração de 0,50 a 3,0 mg L<sup>-1</sup>.

Sensibilidade: calculada a partir do coeficiente angular médio das curvas analíticas obtidas para o nitrato.

Limite de detecção (LOD): calculado a partir de cinco curvas analíticas pela expressão:

$$\text{LOD} = 3 S_{y/x} m^{-1}$$

onde  $S_{y/x}$ : estimativa do desvio padrão da curva analítica e m: coeficiente angular da curva analítica. Os valores foram calculados para uma massa de amostra de 5,0 g.

Limite de quantificação (LOD): calculado a partir de cinco curvas analíticas pela expressão:

$$\text{LOQ} = 10 S_{y/x} m^{-1}$$

onde  $S_{y/x}$ : estimativa do desvio padrão da curva analítica e m: coeficiente angular da curva analítica. Os valores foram calculados para uma massa de amostra de 5,0 g.

Precisão intra-ensaio: foi validada mediante análise consecutiva (n=10) em um mesmo dia de uma solução contendo nitrato na concentração de 1,5 mg L<sup>-1</sup>. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), obtido pela equação:

$$RSD(\%) = s/x \cdot 100$$

onde, s: estimativa do desvio padrão e x: média dos resultados.

Recuperação: as amostras de leite em pó foram fortificadas em dois níveis de concentração (1,0 mg kg<sup>-1</sup>; 2,0 mg kg<sup>-1</sup>). As análises para cada nível de fortificação foram realizadas em triplicata.

#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O número de amostras (n) analisadas foi estabelecido através da equação 1, conforme COCHRAN (1977).

$$400 \left[ \frac{(\text{máx.} - \text{mín.}/6)}{(\text{máx.} + \text{mín.}/2)} \right]^2 \leq n \leq 400 \left[ \frac{(\text{máx.} - \text{mín.}/4)}{(\text{máx.} + \text{mín.}/2)} \right]^2$$

**(Equação 1)**

Onde máx.: teor de nitrato máximo e mín.: teor de nitrato mínimo encontrado nas amostras analisadas. Para obter esses valores máx. e mín. foram analisadas de 2 a 3 amostras (em triplicata) de dois lotes distintos de fórmula infantil para lactentes.

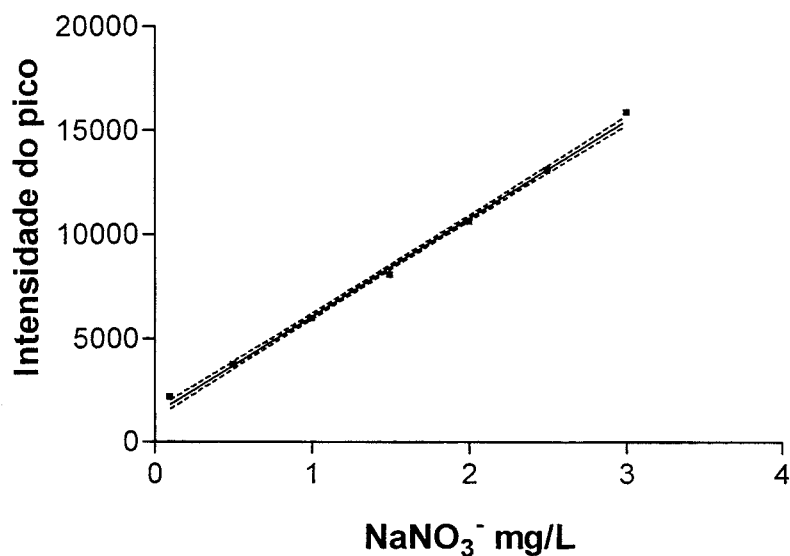
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Otimização do sistema FIA na determinação de nitrato

A quantificação do nitrato foi realizada utilizando sistema FIA, conforme descrito por (ANDRADE et al., 2003). O método baseia-se na redução do nitrato a nitrito em coluna de cádmio cuperizado. Em meio ácido é formado um complexo ternário ( $\text{FeSCNNO}^+$ ) a partir de  $\text{NO}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{SCN}^-$  (tiocianato). O complexo absorve na região do visível do espectro eletromagnético (460 nm), sendo que a absorbância é proporcional a concentração de nitrato e nitrito. O  $\text{NO}$  é gerado em duas etapas: (i) redução do nitrato a nitrito em coluna de cádmio coperizado e (ii) redução do nitrito a  $\text{NO}$  em meio de ácido sulfúrico.

### 5.2. Curva analítica

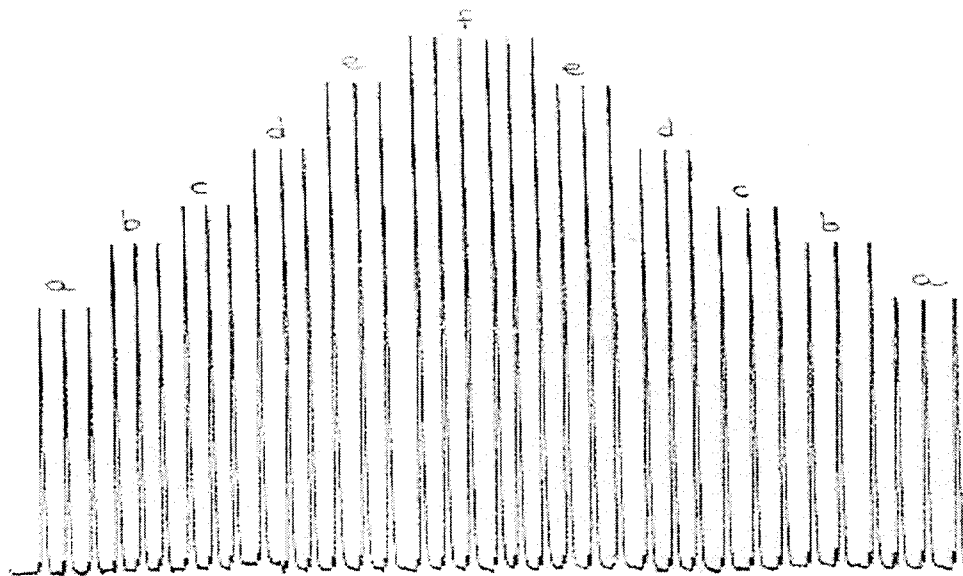
Nas condições estabelecidas em 5.1 foi construída uma curva analítica: altura do pico (ua - unidades arbitrárias) versus concentração em  $\text{mg L}^{-1}$ . A curva analítica obtida está apresentada na **Figura 2**.



**Figura 2.** Curva analítica de nitrato.



Após a ativação da coluna com nitrato  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , foram feitos fiagramas para cada coluna utilizando-se para isso concentrações de nitrato de 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50 e  $3,00 \text{ mg L}^{-1}$ . O fiagrama do nitrato está apresentado na **Figura 3**.



**Figura 3.** Fiagrama do nitrato obtido para soluções de referência. Concentração de nitrato ( $\text{mg L}^{-1}$ ): (a) 0,50; (b) 1,00; (c) 1,50; (d) 2,00; (e) 2,50 e (f) 3,00.

### 5.3. Parâmetros da Validação do Método

A validação do método visa diminuir os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado e por isso tem por objetivo assegurar que o método utilizado seja adequado ao que se propõe quantificar ou identificar, ou seja, que sua performance permita produzir resultados que se enquadrem às necessidades do problema em questão e é muito importante, pois permite que um trabalho analítico seja realizado dentro de parâmetros definidos, levando a uma melhor aceitação dos dados gerados (CHASIN, et al.1998).

O método FIA utilizado para a determinação de nitrato em fórmula infantil foi validado por avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, repetibilidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação ou determinação (LOQ), recuperação em dois níveis, cujos procedimentos estão apresentados em e os respectivos parâmetros estabelecidos estão apresentados na Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1.** Parâmetros de validação do método analítico utilizado na determinação de nitrato em amostras de fórmula infantil para lactentes.

Parâmetros	
Faixa Linear	0.50 – 3.00 mg L <sup>-1</sup>
Linearidade	0.997
Sensibilidade (unidades de absorvância L mg <sup>-1</sup> )	2268
Limite de detecção (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	0.30
Limite de quantificação (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	1.00
Repetibilidade intra-insaio (% RSD,n=10)	1.60 (1.0 mg kg <sup>-1</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )

<sup>a</sup> massa da amostra: 5.0 g

Os valores de recuperação média (n=3) de nitrato em amostras, para os dois níveis de fortificação (1,0 mg kg<sup>-1</sup>; 2,0 mg kg<sup>-1</sup>), variaram no intervalo de 94 a 108%.

**Tabela 2.** Porcentagem de recuperação de nitrato nas amostras estudadas, em 2 níveis de fortificação da amostra (1,0 mg kg<sup>-1</sup> e 2,0 mg kg<sup>-1</sup>).

Amostras analisadas	Recuperação média % (n=3)	
	1,0 (mg kg <sup>-1</sup> )	2,0 (mg kg <sup>-1</sup> )
A1	98	96
A2	99	100
A3	98	101
A4	99	101
A5	100	98
A6	97	97
A7	103	102
A8	97	98
A9	108	102
A10	94	100
A11	102	101
A12	101	106
A13	101	101
A14	104	100
A15	99	100

Os parâmetros de validação avaliados indicam que o método é adequado para a determinação de nitrato na matriz estudada (fórmula infantil para lactentes), além de apresentar as seguintes vantagens em relação ao método recomendado pela AOAC (AOAC, 1997): emprego de reagentes não carcinogênicos, baixo consumo de reagentes e frequência analítica maior do que o método de referência (6 determinações h<sup>-1</sup>).

## 5.2. Determinação do teor de nitrato em fórmula infantil para lactentes

Na Tabela 3 são apresentados os resultados referentes às amostras de fórmula infantil analisadas. As amostras de A a D se referem a fórmulas infantis destinadas a crianças na faixa etária de 0 a 6 meses, onde de um mesmo lote foram analisadas três amostras (latas distintas). As amostras de E a O se referem a fórmulas para crianças de 6 a 12 meses de idade, sendo que de um mesmo lote foram analisadas duas amostras (latas distintas). O teor de nitrato nas amostras variou de valores menores do que o limite de quantificação do método ( $< \text{LOQ}$ ) a  $21,8 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Para verificar a possível presença de nitrito nas amostras analisadas, o extrato obtido de cada amostra também foi injetado no sistema FIA sem a presença da coluna de cádmio cuperizado. Nestas amostras o limite de detecção (LOD) foi de  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$  e o limite de quantificação (LOQ) foi de  $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ . Importante mencionar que em nenhuma das amostras analisadas foi verificada a presença de nitrito.

Cabe ressaltar que a legislação brasileira não dispõe de valores específicos de nitrato para fórmulas infantis, entretanto, os dados obtidos confirmam a presença de nitrato nessa matriz. Sendo assim, indicam a necessidade de estabelecer legislação específica para a presença de nitrato nas fórmulas infantis para lactentes, em particular naqueles de até doze semanas de vida, para assim poder-se realizar ações visando o controle da presença de nitrato nessa matriz, visto que lactentes até o terceiro mês de vida são particularmente susceptíveis a formação de metemoglobina devido à exposição ao nitrato.

Comparando com dados relatados na literatura para leite em pó, onde o teor de nitrato raramente é maior do que  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  (WALKER, 1990; DUARTE & MÍDIO, 1997), os dados obtidos neste trabalho se apresentam dentro da mesma faixa de concentração.

**Tabela 3.** Teor de nitrato em amostras de fórmula infantil para lactentes, expresso como valor médio  $\pm$  a estimativa do desvio padrão absoluto (S), valores mínimos e máximos determinados e coeficiente de variação (CV).

Fórmula infantil*	Lote	Média (mg kg <sup>-1</sup> ) $\pm$ (S) <sup>***</sup>	Valores (mín. – máx.)	CV (%) <sup>****</sup>
A	1	5,5 $\pm$ 0,7	4,8 – 6,2	12,7
A	2	3,5 $\pm$ 0,2	3,3 – 3,7	5,5
B	1	22,0 $\pm$ 2,0	21,0 – 22,0	0,9
B	2	17,0 $\pm$ 1,5	16,5 – 17,5	8,8
C	1	4,0 $\pm$ 0,5	3,1 – 4,8	12,5
C	2	2,0 $\pm$ 0,2	1,9 – 2,3	10,0
D	1	< LOQ		
D	2	2,0 $\pm$ 0,1	1,9 – 2,4	5,0
E	1	< LOQ <sup>**</sup>		
E	2	< LOQ		
F	1	15,0 $\pm$ 0,5	14,9 – 15,6	3,2
F	2	15,5 $\pm$ 0,5	14,9 – 16,1	3,3
G	1	3,0 $\pm$ 0,2	2,8 – 3,1	6,6
G	2	2,0 $\pm$ 0,2	1,8 – 2,3	10,0
H	1	< LOQ		
H	2	2,0 $\pm$ 0,1	1,7 – 1,9	5,0
I	1	< LOQ		
I	2	< LOQ		
J	1	2,0 $\pm$ 0,1	1,8 – 2,2	5,0
J	2	4,0 $\pm$ 0,1	3,8 – 4,4	2,5
K	1	< LOQ		
K	2	3,0 $\pm$ 0,1	2,8 – 3,3	3,3
L	1	13,0 $\pm$ 0,1	12,9 – 13,3	0,77
L	2	12,0 $\pm$ 0,1	11,7 – 12,2	8,3
M	1	3,0 $\pm$ 0,1	2,9 – 3,3	3,3
M	2	3,0 $\pm$ 0,1	2,8 – 3,2	3,3
N	1	4,0 $\pm$ 0,1	3,9 – 4,3	2,5
N	2	7,0 $\pm$ 0,1	7,0 – 7,4	1,43
O	1	< LOQ		
O	2	< LOQ		

\* As letras representam o tipo de produto.

\*\*< LOQ significa que o nível de nitrato estava abaixo do limite de quantificação do método; \*\*\* (S): estimativa do desvio padrão absoluto; \*\*\*\* CV(%): coeficiente de variação.

### 5.3. Estimativa da ingestão diária de nitrato por lactentes

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a melhor opção alimentar para crianças de 0 a 6 meses é o aleitamento materno exclusivo (FREEMAN et al, 2000; LANDE et al., 2003;). A importância de manter o aleitamento materno é comprovada por estudos clínicos que demonstram que os lactentes amamentados têm menor incidência de infecções respiratórias e do trato digestivo, sendo o efeito protetor do leite humano mediado por anticorpos maternos contra patógenos ambientais, bem como por outras substâncias como a lactoferrina e a lisozima (SCARIATI et al., 1997; WOLD & ADLERBERTH, 1998). É importante ressaltar que nenhum outro alimento oferece as características imunológicas do leite materno.

Atualmente, os leites disponíveis no mercado brasileiro e utilizados para a substituição ou complementação da dieta de lactentes, quando se faz necessária, são o leite de vaca, o leite de cabra e o de soja, bem como as fórmulas infantis, a maioria delas proveniente do leite de vaca ou de soja. A opção que à primeira vista parece ser a mais prática e econômica é o uso do leite de vaca, integral ou diluído em água e com adição de farinhas e açúcar como tentativa da fabricação de fórmula infantil artesanal, em domicílio. Todavia, a prática clínica e as pesquisas atuais demonstram que a introdução precoce do leite de vaca não é uma escolha tão vantajosa e econômica, pelos inúmeros prejuízos que irão trazer ao lactente, aumentando a sua morbidade e influenciando na qualidade de vida a curto e longo prazo. Sabe-se que o leite de vaca integral não é indicado para crianças menores de 12 meses por apresentar baixas concentrações de ferro, ácido linoléico e vitaminas, bem como taxas excessivas de sódio, potássio e proteína (FREEMAN et al., 2000). Portanto, no primeiro ano de vida deve-se evitar o leite de vaca e recomendar o uso de fórmulas infantis adaptadas para o lactente, se não houver a possibilidade de manter a amamentação (KAZAL, 2002).

Assim, a melhor opção são os leites modificados de acordo com os padrões do Codex Alimentarius, pois permitem uma nutrição adequada na medida em que fornecem um alimento completo e semelhante ao leite materno (CARVALHO &

BERNAL, 2003). Os substitutos do leite humano para os lactentes estão, atualmente, disponíveis em várias fórmulas infantis. Os progressos deveram-se especialmente ao melhor entendimento da composição do leite materno, pois o avanço das fórmulas foi em direção a sua equiparação ao leite humano (AGGETT et al., 2001). Assim, a segurança e eficácia das fórmulas necessitam serem bem avaliadas.

No presente trabalho, o peso médio considerado para o lactante foi obtido da curva de crescimento (percentil 50 %) recomendada pelo National Center for Health Statistics (NCHS) assim como, o número de medidas e de mamadeiras por dia. Os dados dos teores de nitrato na água foram obtidos, no ano de 2004, pela Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A (SANASA) e são referentes aos níveis de nitrato presentes na água potável consumida na região de Campinas, SP. Esses dados indicam que nesse ano o teor médio de nitrato presente na água foi de  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ , com valores mínimo e máximo de  $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  e  $12,6 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, expressos como íon nitrato.

Na Tabela 4 são apresentados dados de ingestão média e máxima (pior cenário) de nitrato por parte de lactentes com idade de até 12 meses. Assim, são apresentados os níveis de nitrato ingerido por dia proveniente da fórmula infantil utilizando o valor da concentração média ( $5,95 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e máxima ( $21,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) de nitrato verificada nas amostras analisadas assim como o teor médio ( $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e máximo ( $12,6 \text{ mg L}^{-1}$ ) de nitrato presente na água potável de Campinas, SP.

Tabela 4. Estimativa da exposição diária total ao nitrato por lactentes, de até 12 meses de idade, veiculada através da fórmula infantil e da água utilizada no preparo das mamadeiras.

Idade do lactente	Peso Médio do lactente (kg)	Nº de medidas / Nº de mamadeiras por dia	Quantidade de água para o preparo da mamadeira (mL)	Quantidade de nitrato ingerida proveniente da fórmula infantil (mg/kg pc/dia)		Quantidade de nitrato ingerida proveniente da água utilizada no preparo da mamadeira (mg/kg pc/dia)		Quantidade total de nitrato ingerida pelo consumo da mamadeira (mg/kg pc/dia)	
				Considerando o valor médio de nitrato (5,95 mg kg <sup>-1</sup> )	Considerando o valor máximo de nitrato (21,80 mg kg <sup>-1</sup> )	Considerando o valor médio de nitrato (5,0 mg L <sup>-1</sup> )	Considerando o valor máximo de nitrato (12,6 mg L <sup>-1</sup> )	Considerando os valores médios de nitrato presentes na fórmula e na água	Considerando os valores máximos de nitrato presentes na fórmula e na água
1 <sup>as</sup> semanas	3,250	3 / 6	90	0,16	0,60	0,83	2,09	0,99	2,69
1 mês	4,140	3 / 6	90	0,13	0,48	0,65	1,64	0,78	2,12
2 meses	4,900	4 / 6	120	0,14	0,53	0,73	1,85	0,87	2,38
3 meses	5,690	5 / 5	150	0,13	0,47	0,66	1,66	0,79	2,13
4 meses	6,400	6 / 5	180	0,14	0,50	0,70	1,77	0,84	2,27
5 meses	7,130	7 / 4	210	0,12	0,42	0,59	1,48	0,71	1,90
6 meses	7,900	7 / 3	210	0,08	0,29	0,40	1,00	0,48	1,29
9 meses	8,900	7 / 3	210	0,07	0,25	0,30	0,89	0,37	1,14
12 meses	9,900	7 / 3	210	0,06	0,23	0,32	0,80	0,38	2,03



Se somente for considerada a concentração de nitrato na fórmula infantil, teremos uma variação de ingestão de nitrato na faixa de 0,06 a 0,60 mg/kg de peso corpóreo/dia. Os valores encontrados, especificamente, nestas amostras são compatíveis com dados da literatura (WALKER, 1990; OLIVEIRA & GLÓRIA, 1993; DUARTE & MÍDIO, 1997) apresentando-se dentro de um limite que não reflete perigo a saúde do lactente (WHO, 1996).

Cabe destacar, outrossim, que a legislação brasileira considera como impróprio para o consumo, o leite que contenha nitratos e nitritos em qualquer concentração (BRASIL, 1952). Para as fórmulas infantis em pó para lactentes também não há especificação na legislação. Ainda, a Portaria nº 34, de 13 de janeiro de 1998, publicada no Diário Oficial da União do Poder Executivo (BRASIL, 1998) aprova o regulamento técnico referente a alimentos de transição para lactentes e crianças de primeira infância. Por esta Portaria, o teor de nitrato permitido para produtos desidratados, expresso em íon nitrato, é de no máximo 250 mg kg<sup>-1</sup> do produto reconstituído; para alimentos líquidos o valor é o mesmo. Todavia, conforme a Portaria "Não estão cobertos por este regulamento as Fórmulas Infantis e os Alimentos Processados à Base de Cereais para Alimentação Infantil" (BRASIL, 1998).

O nitrato e nitrito servem como um importante indicador da qualidade de água natural. O nitrito é rapidamente oxidado a nitrato na água e é raramente encontrado em água clorada (COOPERATIVE RESEARCH CENTRE, 1996). A concentração de nitrito na água superficial é usualmente baixa, entre 0 a 18 mg L<sup>-1</sup>, enquanto que a concentração natural em água subterrânea é somente de alguns miligramas por litro (WHO, 1998a). O aumento do nível de nitrato em água é resultante principalmente da agricultura pela aplicação de fertilizantes, assim como consequência de processos industriais (PUCKETT, 1995).

No Brasil, a Resolução nº 310, de 16 de junho de 1999, estabelece para água potável os limites de 50 mg L<sup>-1</sup>, calculado como nitrato (ou de 10 mg L<sup>-1</sup> de nitrato-nitrogênio) e 0,02 mg L<sup>-1</sup>, calculado como nitrito (BRASIL, 2001).

Inúmeros casos de intoxicação seguida da ingestão de água de poços contendo altas concentrações de nitrato têm sido relatados, 97% dos quais foram

associados com níveis de nitrato de 45,0 a 88,6 mg de íon nitrato L<sup>-1</sup> (WHO, 1985). Casos de metemoglobinemia têm sido observado em lactentes usando água contendo nitrato, em níveis mais altos do limite máximo do contaminante (MCL) de 45 mg L<sup>-1</sup>, calculado como nitrato, mas não abaixo do limite máximo do contaminante. KNOBELOCH, 2000; relatou casos de metemoglobinemia infantil associados com o uso de água de poços contaminadas usadas para diluir a fórmula concentrada, as concentrações encontradas foram de 22,9 a 27,4 mg L<sup>-1</sup> de nitrato-nitrogênio.

Dados obtidos pela Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A (SANASA) referentes aos níveis de nitrato presentes na água potável consumida na região de Campinas, SP, indicam que no ano de 2004, o teor médio de nitrato presente na água foi de 5,0 mg L<sup>-1</sup>, com valores mínimo e máximo de 3,2 mg L<sup>-1</sup> e 12,6 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, expressos como íon nitrato.

Para crianças com idade inferior a três meses os nitratos representam um grande risco por serem mais susceptíveis a desenvolverem metemoglobinemia devido a vários fatores: (1) possuem baixa acidez gástrica, o que favorece o crescimento de bactérias capazes de reduzir nitrato a nitrito, o qual pode interagir com a hemoglobina afetando o transporte de oxigênio levando o metemoglobinemia; (2) apresentam deficiência fisiológica transitória da metemoglobina redutase ou de seu co-fator NADH; (3) a ingestão de água é maior que o peso relativo corporal; (4) em algumas raças, a deficiência congênita de glicose-6-fosfato desidrogenase em eritrócitos pode resultar em uma deficiência secundária de Metemoglobina redutase (WHO, 1978; JAFÉ, 1981; WALKER, 1996; McKNIGHT et al., 1999). Além disso, no sangue de crianças dessa idade existe uma quantidade considerável de hemoglobina fetal (hemoglobina F) que se transforma em metemoglobina (MetHb) mais facilmente que a hemoglobina adulta (hemoglobina A) (FERNÍCOLA, 1989; WALKER, 1990; ECHANIZ et al, 2001). A concentração letal de MetHb não é conhecida, mas foi observado que em concentrações superiores a 50 % podem provocar a morte (WHO, 1978; BORONAT et al., 1982). A estimativa real da dose letal em adultos é de 20 g de íon nitrato ou 330 mg de íon nitrato/kg peso corpóreo (LEU et al., 1986).

A determinação do nitrato total ingerido diariamente pelo lactente foi obtida com os dados de consumo das mamadeiras preparadas com as fórmulas infantis e a quantidade de água utilizada para dissolução, e variou de 0,37 a 2,69 mg/kg pc/dia. Cabe destacar que os maiores valores de exposição foram verificados nos lactentes com idade inferior a três meses. Sendo assim, indicam a necessidade de estabelecer legislação específica para a presença de nitrato nas fórmulas infantis para lactentes para assim poderem ser realizadas ações visando o controle da presença de nitrato nessa matriz, visto que lactentes, até o terceiro mês de vida, são particularmente susceptíveis a formação de metemoglobina devido a exposição ao nitrato. Ainda, os dados indicam que no primeiro ano de vida, a exposição ao nitrato que é veiculado pela água utilizada no preparo da mamadeira é 3,5 a 5,0 vezes maior do que aquela proveniente da fórmula infantil.

## 6. CONCLUSÕES

O método de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de nitrato através do complexo ternário FESCNNO<sup>+</sup> é adequado para o monitoramento de nitrato em fórmula infantil para lactentes. As figuras analíticas de mérito avaliadas na validação também se mostraram adequadas para determinação, além do método apresentar vantagens como emprego de reagentes não carcinogênicos, baixo consumo de reagentes e frequência de amostragem (30 injeções h<sup>-1</sup>).

O teor de nitrato nas amostras analisadas variou de valores menores do que o limite de quantificação do método (1,00 mg kg<sup>-1</sup>) a 21,8 mg kg<sup>-1</sup>, sendo que esses níveis de nitrato presentes nas fórmulas infantis analisadas, por si só, não colocam em risco a saúde do lactente, estando dentro de um limite aceitável. Verificou-se que a exposição ao nitrato pelo lactente, com idade de até 12 meses, foi 3,3 a 5,0 vezes maior pela água do que pela fórmula infantil.

A legislação brasileira não dispõe de valores específicos de nitrato para fórmulas infantis. Entretanto, considerando que amostras analisadas apresentaram a presença de nitrato, os dados obtidos poderão ser utilizados para estabelecer legislação específica quanto à presença de nitrato em fórmula infantil para lactente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGET, P.J.; AGOSTINI, C.; GOULET, O.; HERNELL, O.; KOLETZKO, B.; LAFEBER, H.L.; MICHAELSEN, K.F.; RIGO, J.; WEAVER, L. T. The nutritional and safety assessment of breast milk substitutes and other dietary products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 32(3), 256-258, 2001.
- AHMED, M.J.; STALIKAS, C.D.; TZOUWARA-KARAYANNI, S.M.; KARAYANNIS, M.I. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow-injection analysis. *Talanta*, 43, 1009-1019, 1996.
- ANDRADE, R.; VIANA, C.O.; GUANAGNIN, S.R.; REYES, F.G.R.; RATH, S. A Flow-injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide geration. *Food Chemistry*, 80, 597-602, 2003.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists: agriculture chemical contaminants' drugs. Method 982.22 (16th ed.) Gaithersburg, 1997.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists: agriculture chemical contaminants' drugs. Method 984.18 (16th ed.) Gaithersburg, 1997.
- ARAÚJO, A.C.P.; MÍDIO, A.F. Nitratos y nitritos em alimentos infantiles industrializados y caseros. *Alimentaria*, Madrid, 27, nº209, 69-75, 1990.
- BERTOTTI, M.; PLETCHER, D. Amperometric determination of nitrite via reaction with iodide using microelectrodes. *Analytica Chimica Acta*, 337, 49-55, 1997.
- BORONAT, M.D.C.T.; PADROS, R.B.; ALONSO, M.I. Nitratos y nitritos en la alimentacion infantil: riesgos de su ingesta. *Alimentaria*, 138, 31-35, 1982.
- BRASIL. Decreto nº 30691, art. 542, do Ministério da Saúde da Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS/MS. *Diário Oficial da União*, 07 de julho 1952. Disponível em (<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>). Acesso em 03/03/04.

BRASIL. Resolução nº 34/1998, art.4º, do Ministério da Saúde da Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS/MS. *Diário Oficial da União*, 13 jan. 1998. Disponível em (<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>). Acesso em 13/05/04.

BRASIL. Portaria MS nº 1.469, 29 de dezembro de 2000. Regulamento técnico na Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano. *Diário Oficial da União*, Brasília DF, 2 Jan. 2001. Disponível em (<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>). Acesso em 05/02/04.

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

CARVALHO, E.; BERNAL, A.G. Alimentação para lactentes de 6 a 12 meses. *Temas de pediatria*, 75, 5-20, 2003.

CHASIN, A. M.; NASCIMENTO, E. S.; NETO, L. M. R.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 11, 1-6, 1998.

COCHRAN, W.G. *Sampling techniques*, 3ª ed. J. Wiley, New York, 1977, 428p.

COOPERATIVE RESEARCH CENTRE FOR WATER QUALITY AND TREATMENT. *Fact Sheets – Inorganic Chemicals* (Fact Sheet number 61), Canberra, 1996.

DUARTE M.; MIDIO, A.F. Sorolácteo: características nutricionais e riscos na sua utilização, *Higiene Alimentar*, 11(47), 23-25, 1997 a.

ECHANIZ, J.S.; FERNANDEZ, J.B.; RASO, S.M. Methemoglobinemia and Consumption of Vegetables in Infants. *Pediatrics*, 107 (5), 2001.

FERNÍCOLA, N.A.G.G. Metahemoglobina infantil causada por nitratos. *Boletim Oficial Sanitário Panamericana*, 106, 32-39, 1989.

FERREIRA, S.M.R.; CAMARGO, L. Aditivos em alimentos. *Boletim CEPPA*, 11,160-176, 1993.

FREEMAN, V.; VAN'T HOLF, M.; HASCHKE, F. Patterns of milk and food intake in

infants from birth to age 36 months: the Euro-growth study. *Journal of Pediatrics, Gastroenterology and Nutrition*, 31(1), S76-85, 2000.

GABRIEL, D.; BAEZA, J.; VALERO, F.; LAFUENTE, J. A novel FIA configuration for the simultaneous determination of nitrate and nitrite and its use for monitoring an urban waste treatment plant based on N/D criteria. *Analytica Chimica Acta*, 359, 173-183, 1998.

JAFFÉ, E.E. Methaemoglobinaemia. *Clinical Haematology*, 10, 99-122, 1981.

KAWAKAMI, T.; IGRASHI, S. Highly sensitive spectrophotometric determination of nitrite ion using 5,10,15,20-tetrakis (4-aminophenyl)porphine for application to natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 333, 175-180, 1996.

KAZAL, L.A.J. Prevention of iron deficiency in infants and toddlers. *American Family Physician*, 66(7), 1217-1224, 2002.

KNOBELOCK, L.; SALNA, B.; HOGAN, A.; POSTLE, J.; ANDERSON, H. Blue Babies and nitrate-contaminated well water. *Environmental Health Perspectives*, 108 (7), 2000.

KROSS, B.C.; AYEBO, A.D.; FUORTES, L.J. Methaemoglobinaemia: nitrate toxicity in rural America. *American Family Physician*, 46, 183-188, 1992.

LANDE, B.; ANDERSEN, L.F.; BAERUG, A.; TRYGG, KU, LUND-LARSEN, K.; VEIEROD, M.B.; AA BJORNEBOE, G.E. Infant feeding practices and associated factors I the first six months of life: the Norwegian infant nutrition survey. *Acta Paediatrica*, 92(2), 152-161, 2003.

LARA, W.H.; TAKAHASHI, M.Y.; SILVEIRA, N. Determination of nitrites and nitrates in cured meat. *Revista instituto Adolfo Lutz*, 38, 161-166, 1978.

LEU, D.; BIEDERMANN, J.; DETTWEILER, J.; HOIGNÉE, J.; STALDELMANN, F.X. Bericht über Nitrate in Trinkwasser-Standortbestimmung. *Mitt. Geb. Lebensmitt-Untersuch. Hyg.* 77, 227-315, 1986 (cited in Who, 1985).

LI, H.; MEININGER, C.J.; WU, G.Y. Rapid determination of nitrite by reversed-phase HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography, B.*, 746, 199-207, 2000.

LIANG, B.; IWATSUKI, M. FUKASAWA, T. Catalytic spectrophotometric determination of nitrite using the chlorpromazine hydrogen-peroxide redox reaction in acetic-acid medium. *Analyst*, 119 (9), 2113-2117, 1994.

McKNIGHT, G.M.; DUNCAN, C.W.; LEIFERT, C.; GOLDEN, M.H. Dietary nitrate in man: friend or foe? *British Journal of Nutrition*, 81, 349-358, 1999.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. *Statistics for Analytical Chemistry*. 3<sup>a</sup> ed. Ellis Horwood Limited, 1993. 233 p.

National Center for Health Statistics (NCHS) in collaboration with the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Data modified 20/04/01. Disponível: <<http://www.cdc.gov/growthcharts>>. Acesso em 12 Nov. 2004.

OLIVEIRA, C.P. & GLÓRIA M.B.A. Teores de nitratos e nitritos em alimentos infantis industrializados contendo soro de leite. *Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes*, 48(287), 21-26, 1993.

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

PUCKETT, L.J. *Environmental Science and Technology*, 29 (9), 408a, 1995.

SCARIATI, P.D.; GRUMMER-STRAWN, FEIN, S.B. A longitudinal analysis of infant morbidity and the extense breastfeeding in the United States. *Pediatrics*, 99(6), E5, 1997.

SCHALLER, U.; BAKERR, E.; SPICHIGER, U.E.; PRETSCH, E. Nitrite-selective microeletrodes. *Talanta*, 41, 1001-1005, 1994.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and



the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 812, 99-109, 1998.

SIU, D.C.; HENSHALL, A. Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in meat products. *Journal of Chromatography A*, 179, 341-349, 1998.

VAN STADEN, J.F. Automated simultaneous determination of nitrate and nitrite by pre-valve reduction of nitrate in a flow-injection system. *Analytica Chimica Acta*, 138, 403-408, 1982.

WALKER, R. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Additives and Contaminants.*, 7, 717-768, 1990.

WALKER, R. The metabolism of dietary nitrites and nitrates. *Biochemical Society Transactions*, 24, 780-785, 1996.

WHO. Nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds. Geneva, World Health Organization, (Environmental Health Criteria n° 5), 107p., 1978.

WHO. Health Hazards From Nitrates in Drinking water. Geneva, World Health Organization, 1985.

WHO. Food Additives Series No 35. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives. Forty forth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, Geneva, 1996.

WHO. Guidelines for drinkin-water Quality, 2<sup>nd</sup> Ed.; Addendum to volume 2. *Health criteria and other supporting Information*, Geneva, 1998a.

WHO. Food Additives Series No 50. *Safety Evaluation of Certain Food Additives*. Fifty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva, 2003.

WOLD, A.E.; ADLERBERTH, I. Does breastfeeding affect the infant's immune responsiveness? *Acta Pediatric*, 87(1), 19-22, 1998.

XIMENES, M.I.N.; RATH, S.; REYES, F.G.R. Polarographic determination of nitrate in vegetables. *Talanta*, 51, 49-56, 2000.

## CONCLUSÕES GERAIS

O método de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de nitrato através do complexo ternário FESCNO<sup>+</sup> é adequado para o monitoramento de nitrato em fórmula infantil para lactentes. As figuras analíticas de mérito avaliadas na validação também se mostraram adequadas para determinação, além do método apresentar vantagens como emprego de reagentes não carcinogênicos, baixo consumo de reagentes e alta frequência de amostragem (30 injeções h<sup>-1</sup>).

O teor de nitrato nas amostras analisadas variou de valores menores do que o limite de quantificação do método (1,00 mg kg<sup>-1</sup>) a 21,8 mg kg<sup>-1</sup>, sendo que esses níveis de nitrato presentes nas fórmulas infantis analisadas, por si só, não colocam em risco a saúde do lactente, estando dentro de um limite aceitável. Verificou-se que a exposição ao nitrato pelo lactente, com idade de até 12 meses, foi 3,3 a 5,0 vezes maior pela água do que pela fórmula infantil.

Cabe ressaltar que se elevados teores de nitrato forem encontrados em água ou fórmula infantil, utilizado no preparo da mamadeira, esta será a principal fonte de exposição do lactente ao nitrato colocando em risco sua saúde. Portanto a legislação deveria estabelecer valores de IDA específicos para lactentes onde possam ser utilizados como referência para a Vigilância Sanitária assegurando proteção à saúde dos lactentes.

A legislação brasileira não dispõe de valores específicos de nitrato para fórmulas infantis. Entretanto, considerando que amostras analisadas apresentaram a presença de nitrato, os dados obtidos poderão ser utilizados para estabelecer legislação específica quanto à presença de nitrato em fórmula infantil para lactente.