

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

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE NITRATO EM HORTALIÇAS
FOLHOSAS PRODUZIDAS POR DIFERENTES
SISTEMAS DE CULTIVO**

Silvane Guerra Guadagnin
Farmacêutica bioquímica

Prof. Dr. Felix G. Reyes Reyes
Orientador

Prof. Dr. Susanne Rath
Co-orientadora

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

Campinas - SP
2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

G93a Guadagnin, Silvane Guerra
Avaliação do teor de nitrato em hortaliças folhosas
produzidas por diferentes sistemas de cultivo / Silvane
Guerra Guadagnin. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Hortaliças. 2.Nitratos. 3.Hidroponia. I.Reyes Reyes,
Felix Guillermo. II.Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Felix G. R. Reyes
FEA-UNICAMP
Presidente

Adriana Vitorino Rossi
IQ-UNICAMP
Membro

Silvia Cazenave
PUC-Campinas
Membro

Helena Teixeira Godoy
FEA-UNICAMP
Membro

Campinas – SP, 2004

Dedico e agradeço especialmente a meus pais

Neusa e Silvio.

*A meus irmãos **Cátia e Guilherme.***

*E ao meu amor **Rodrigo.***

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelas conquistas alcançadas e por guiar meus passos.

Aos meus pais **Neusa** e **Silvio** pela vida, amor e incentivo.

Ao meu “amor” **Rodrigo** pelo amor, compreensão, apoio e estímulo constante.

Aos meus irmãos **Cátia** e **Guilherme**, e ao meu cunhado **Luciano** pelo carinho e apoio.

À **Faculdade de Engenharia de Alimentos**, especialmente ao **Departamento de Ciências de Alimentos**, pela oportunidade em realizar o curso.

Aos professores **Felix e Susanne** pela amizade, ensinamentos e orientação durante o curso.

Aos professores **Sylvio Honório e Antônio Bliska** pela colaboração e ensinamentos.

Aos membros da **Banca Examinadora** pelas sugestões apresentadas.

À professora. **Marta do Canto** pelo incentivo.

À amiga **Elizete** pela amizade, estímulo e apoio.

Às amigas **Camila, Lísia e Juliana** pela amizade, carinho e companheirismo.

Às amigas **Cláudia e Raquel A.** pela amizade e contribuição na realização das análises.

Às amigas **Elede e Regiane** pela amizade, carinho e companheirismo.

Às amigas **Daniela, Raquel G. e Sabrina** pela amizade, ainda que distante.

Aos amigos **Cedenir, Roger, Cristiano e Fabiane** pela amizade.

Aos **colegas do curso** pela amizade.

A **CAPES** pela bolsa de estudo concedida.

A todas as pessoas que não foram mencionadas e que de alguma forma auxiliaram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada.

Silvane

ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	xi
SUMMARY.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESENÇA DE NITRATO EM VEGETAIS.

UMA REVISÃO.....	8
RESUMO.....	8
SUMMARY.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OCORRÊNCIA DO NITRATO NOS VEGETAIS.....	11
3. EXPOSIÇÃO HUMANA AO NITRATO.....	14
4. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS.....	16
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO TEOR DE NITRATO EM HORTALIÇAS FOLHOSAS

PRODUZIDAS POR DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO.....	30
RESUMO.....	30
SUMMARY.....	31
1. INTRODUÇÃO.....	32
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4. CONCLUSÕES.....	49
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

CAPÍTULO 3

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO NA SOLUÇÃO NUTRITIVA E DO PERÍODO SAZONAL NO ACÚMULO DE NITRATO EM ALFACE HIDROPÔNICA.....	56
RESUMO.....	56
SUMMARY.....	57
1. INTRODUÇÃO.....	58
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4. CONCLUSÕES.....	72
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
CONCLUSÕES GERAIS.....	75

TABELAS

CAPÍTULO 1. Considerações sobre a presença de nitrato em vegetais. Uma revisão

Tabela 1. Teor de nitrato em vegetais.....	12
--	----

CAPÍTULO 2. Avaliação do teor de nitrato em hortaliças folhosas produzidas através de diferentes sistemas de cultivo

Tabela 1. Número de amostras dos vegetais analisados por produtor nos distintos sistemas de cultivo.....	36
Tabela 2. Parâmetros de validação para o método FIA.....	40
Tabela 3. Porcentagem de recuperação de nitrato nas amostras estudadas, em níveis de fortificação de 30 e 60%.....	41
Tabela 4. Teor de nitrato em agrião, alface e rúcula procedentes de diferentes sistemas de cultivo.....	42
Tabela 5. Teor de nitrato em diferentes partes da planta.....	44
Tabela 6. Estimativa da ingestão diária máxima de íon nitrato a partir do consumo de agrião, alface e rúcula.....	48

CAPÍTULO 3. Efeito da concentração de nitrato na solução nutritiva e do período sazonal no acúmulo de nitrato em alface hidropônica

Tabela 1. Composição (m %) do Kristalon Laranja.....	62
Tabela 2. Composição do Tenso Cocktail.....	63
Tabela 3. Composição do nitrato de cálcio.....	63
Tabela 4. Composição das soluções nutritivas utilizadas no estudo.....	63
Tabela 5. Teores médios de nitrato em alface cultivada por hidroponia, em diferentes estágios de maturação, nos períodos de verão e de inverno.....	67

FIGURAS

CAPÍTULO 2. Avaliação do teor de nitrato em hortaliças folhosas produzidas por diferentes sistemas de cultivo.

Figura 1.	Sistema FIA para a determinação de nitrato.....	38
Figura 2.	Teor médio de nitrato em alface procedente da agricultura orgânica, convencional e hidropônica, cultivada por diferentes produtores no período de outono a inverno.....	44
Figura 3.	Influência do tipo de cultivo e período sazonal no teor médio de nitrato em agrião.....	46
Figura 4.	Influência do tipo de cultivo e período sazonal no teor de nitrato em alface.....	46
Figura 5.	Influência do tipo de cultivo e período sazonal no teor médio de nitrato em rúcula.....	47

CAPÍTULO 3. Efeito da concentração de nitrato na solução nutritiva e do período sazonal no acúmulo de nitrato em alface hidropônica.

Figura 1.	Dados relativos às massas das plantas cultivadas nas diferentes soluções nutritivas, nos períodos de verão e inverno.....	68
Figura 2.	Teor de nitrato nas plantas cultivadas nas diferentes soluções nutritivas, nos períodos de verão e inverno.....	70

ANEXOS

Anexo I.	Curva analítica do íon nitrato.....	77
Anexo II.	A flow-injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide generation.....	78

RESUMO GERAL

O nitrato está naturalmente presente nos vegetais como fonte de nitrogênio para seu crescimento, sendo que seu teor depende de fatores genéticos, da disponibilidade desse nutriente para a planta e de fatores ambientais. Estima-se que mais de 70% do nitrato ingerido diariamente pelo homem são fornecidos pelos vegetais. O presente trabalho avaliou o teor de nitrato em hortaliças folhosas (agrião, alface e rúcula) produzidas por diferentes sistemas de cultivo (convencional, orgânico e hidropônico) e estimou a ingestão diária de nitrato proveniente do consumo desses vegetais pela população. A amostragem foi realizada no período de Junho/2001 a Fevereiro/2003, sendo que as hortaliças foram adquiridas junto aos produtores, em feiras e em supermercados da região de Campinas, São Paulo. A extração do nitrato das amostras seguiu o procedimento recomendado pela AOAC, sendo que o método utilizado para a determinação de nitrato foi análise por injeção em fluxo (FIA), com detecção espectrofotométrica do complexo ternário FeSCNNO^+ em 460 nm. Foi verificada diferença ($P < 0,05$) entre os três sistemas de cultivos, quanto ao teor médio de nitrato em alface e rúcula, sendo que no sistema orgânico foi inferior ao do cultivo convencional, e este inferior ao do hidropônico. Para as amostras de agrião, não foi verificada diferença ($P < 0,05$) entre os cultivos orgânico e hidropônico, os quais apresentaram teor de nitrato superior ($P < 0,05$) ao das amostras cultivadas convencionalmente. O teor de nitrato para cada espécie vegetal variou entre produtores, em diferentes partes da planta e com relação ao período sazonal. Dentre as hortaliças incluídas neste estudo, as cultivadas por hidroponia são as responsáveis pela maior contribuição na ingestão de nitrato, representando cerca de 8,6% do valor de ingestão diária aceitável (IDA) estabelecida para este íon (3,7 mg de íon nitrato kg^{-1} de peso corporal por dia). Também foi verificado o efeito da concentração de nitrato na solução nutritiva e do período sazonal no acúmulo de nitrato em alface cultivada por hidroponia. As plantas foram submetidas a três

tratamentos: solução nutritiva recomendada pelo fabricante, contendo 152 mg/L de nitrato (SN), SN menos 25% m/v de nitrato (SN-25) e SN mais 25% m/v de nitrato (SN+25). Os ensaios foram realizados em fevereiro/março (verão) e julho/agosto (inverno) de 2002. No verão foi verificada diferença ($P<0,05$) entre os três tratamentos, sendo que o teor médio de nitrato nas alfaces cultivadas com a solução SN+25 foi superior ao das cultivadas com a SN e este superior ao da SN-25. Este comportamento não foi verificado no inverno, onde o teor médio de nitrato não diferiu ($P<0,05$) entre os tratamentos. Verificou-se diferença ($P<0,05$) entre o teor de nitrato nas alfaces cultivadas no verão e inverno, exceto as cultivadas na solução SN. As plantas cultivadas na solução SN-25 apresentaram maior acúmulo de nitrato no inverno, ao passo que nas cultivadas na solução SN+25 no inverno, o teor desse íon foi inferior comparado ao verão. No verão, a diminuição da concentração de nitrato na solução nutritiva (SN-25) prejudicou o crescimento, coloração e uniformidade foliar das plantas. Já no inverno, o excesso de nitrato na solução nutritiva (SN+25) inibiu o acúmulo desse íon na planta, assim como prejudicou o crescimento da mesma. Esses resultados indicam a importância do controle do teor de nitrato na solução nutritiva no cultivo por hidroponia. O teor de nitrato nos vegetais estudados foi dependente do sistema de cultivo, da parte da planta, assim como do período sazonal em que foram cultivados. Em geral, vegetais folhosos cultivados por hidroponia apresentam teor de nitrato superior àqueles produzidos por cultivo convencional e orgânico. A ingestão diária máxima de nitrato calculada a partir do consumo das hortaliças estudadas, representa cerca de 8,6% do valor de ingestão IDA estabelecida para este íon.

Palavras-chaves: hortaliças folhosas; nitrato; sistema de cultivo.

SUMMARY

Nitrate is naturally present in vegetables as a nitrogen source for their growth, the amount depending on genetic factors, the availability of this nutrient for the plant and environmental factors. It has been estimated that more than 70% of the nitrate ingested daily by man is supplied by vegetables. The present work evaluated the nitrate content in leafy vegetables (watercress, lettuce and arugula) produced by different systems of cultivation (conventional, organic and hydroponic). The daily nitrate ingestion from the consumption of these vegetables by the population was also evaluated. Sampling was carried out during the period from June/2001 to February/2003, the vegetables being acquired directly from producers, from markets and supermarkets from Campinas, São Paulo. Nitrate was extracted from the samples using the procedure recommended by AOAC. A flow injection analysis (FIA) spectrophotometric method was used for the nitrate determination of the ternary complex FeSCNNO^+ at 460 nm. A difference was verified ($P < 0.05$) amongst the three systems of cultivation for the average nitrate content in lettuce and arugula, the level found in the organic system being lower than that in conventional culture which in turn, was lower than that in the hydroponic system. For the watercress samples no difference ($P < 0.05$) was found between the organic and hydroponic cultivated samples, both presenting higher nitrate contents ($P < 0.05$) than the conventionally cultivated samples. The nitrate content for each vegetable species varied between producers, between different parts of the plant and in relation to the season. Of the vegetables examined in this study, those cultivated by hydroponics were responsible for the higher contribution to nitrate ingestion, representing about 8.6% of the value for the acceptable daily intake (ADI) established for this ion ($3,7 \text{ mg of ion nitrate kg}^{-1} \text{ of body weight day}^{-1}$). The effect of the nitrate concentration in the nutrient solution and of the season on the accumulation of nitrate in lettuce cultivated by hydroponics was also verified. The plants were submitted to three treatments: nutrient solution recommended by the

manufacturer, containing 152 mg/L of nitrate (NS), NS minus 25% m/v of nitrate (NS-25) and NS plus 25% m/v of nitrate (NS+25). The assays were carried out in February/March (summer) and July/August (winter) of 2002. In the summer, a difference ($P<0.05$) between the three treatments was verified, the average nitrate content in the lettuces cultivated in the NS+25 being higher than that of those cultivated in the NS which was higher than those cultivated in NS-25. This behavior was not shown in the winter season, where the average nitrate content did not differ ($P<0.05$) between the treatments. A difference ($P<0.05$) was found in the nitrate content between the lettuces cultivated in the summer and those cultivated in the winter, except for those cultivated in the NS solution. The plants cultivated in NS-25 solution presented a greater accumulation of nitrate in the winter, whereas those cultivated in the NS+25 solution showed a lower content of this ion in the winter than in the summer. In the summer, a reduction in the nitrate concentration in the nutrient solution (NS-25) was detrimental to growth, color and leaf uniformity of the plants. In the winter, excess nitrate in the nutrient solution (NS+25) inhibited the accumulation of this ion in the plant, as well as harming its growth. These results indicate the importance of controlling the nitrate content of the nutrient solution in the hydroponics cultivation system. The nitrate content in the vegetables was dependent on the cultivation system, the part of the plant and the season when they were cultivated. Leafy vegetables cultivated hydroponically present a higher nitrate content than those produced by conventional and organic cultures. The maximum daily nitrate intake calculated from the consumption of the vegetables under study, represented about 8.6% of the value for the ADI established for this ion.

Keywords: leafy vegetable; nitrate; cultivation system.

INTRODUÇÃO GERAL

O nitrato está naturalmente presente no ambiente, na água e em alimentos de origem vegetal, ou é usado como aditivo alimentar, principalmente como conservante e agente antimicrobiano em queijos e produtos cárneos. Nos vegetais, o nitrato se encontra naturalmente presente, visto que a planta o utiliza como fonte de nitrogênio para seu crescimento (WALKER, 1975).

O teor de nitrato nos tecidos vegetais é determinado por vários fatores, com destaque para: luminosidade, disponibilidade de nitrato e molibdênio, interação de nutrientes, tipos e fontes de adubos nitrogenados. Em adição, a concentração de nitrato depende também da temperatura, umidade relativa do ar, do horário de colheita, do sistema de cultivo, do estágio de maturação, da parte e espécie da planta. (MAYNARD et al., 1976; VAN DER BOON et al., 1990; STEINGRÖVER et al., 1993; LYONS et al., 1994; McCALL & WILLUMSEN, 1998; AMR & HADIDI, 2001; GENT, 2003).

O teor de nitrato também varia com a época sazonal de cultivo, uma vez que a duração do dia, ao qual são submetidas às plantas, influencia na atividade da enzima nitrato redutase. Em fotoperíodos curtos (inverno) o acúmulo tende a ser maior (VAN DER BOON et al, 1990).

O emprego de fertilizantes químicos nitrogenados pode levar a maior acúmulo de nitrato em alguns vegetais, quando a absorção exceder a assimilação (BLOM-ZANDSTRA, 1989). Estudos comparativos têm demonstrado uma menor concentração de nitrato em vegetais cultivados pela agricultura orgânica em relação a convencional (STOPES et al., 1989; GENTO, 1994; WOESE, et al., 1997; YORDANOV et al., 2001; BOURN & PRESCOTT, 2002). Porém alguns estudos não indicaram essa diferença (PÉRES-LLAMAS et al., 1996; MALMAURET, et al., 2002) e em outros tenha sido relatado o oposto (GENT, 2002; MARTIN & RESTANI, 2003).

Algumas espécies de vegetais, tais como beterraba, aipo, alface e espinafre podem acumular mais de 2500 mg de nitrato por kg de matéria fresca (BLOM-ZANDSTRA, 1989). Alfaces cultivadas sob hidroponia no norte da Europa, no inverno, podem acumular até 6000 mg kg⁻¹ (VAN DER BOON et al., 1990).

Na maioria das dietas, os vegetais em geral constituem a maior fonte de nitrato ingerido. Estima-se que os vegetais contribuem com mais de 70% do nitrato total ingerido. Em particular, vegetais verdes folhosos têm uma maior contribuição para a exposição alimentar devido à alta concentração de nitrato presente nestes (DICH et al., 1996; YSART et al., 1999; PETERSEM & STOLTZE, 1999).

A importância do nitrato para saúde humana está relacionada ao fato que nitrato é facilmente convertido a nitrito, o qual pode interagir com a hemoglobina afetando o transporte de oxigênio e levando a metaemoglobinemia. O nitrito também reage com aminas secundárias e terciárias formando compostos N-nitrosos (WALKER, 1990), os quais podem estar associadas com um alto risco de câncer gástrico, hepático e de esôfago (SIDDIQI, et al., 1992; WU et al., 1993; MITACEK et al., 1999; KIM et al., 2002), embora dietas ricas em vegetais, importantes fontes de vitaminas, estejam sendo associadas à diminuição do risco de câncer (WHO, 1996). Estudos sugerem que nitrato pode ter efeitos benéficos no trato gastrointestinal, atuando como protetor contra microrganismos patogênicos. (McKNIGHT et al., 1997).

Considera-se o íon nitrato de baixa toxicidade, mas quando reduzido a nitrito pode representar um alto risco à saúde. Assim, os valores de ingestão diária aceitável (IDA) estabelecida pelo Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) para nitrato e nitrito são de 0-3,7 mg de íon nitrato kg⁻¹ de peso corpóreo e de 0-0,07 mg de íon nitrito kg⁻¹ de peso corpóreo, respectivamente (WHO, 2003).

A preocupação com os altos teores de nitrato em vegetais fez com que vários países europeus estabelecessem como limite máximo permitido para alface produzida em casa de vegetação teores de nitrato na massa de matéria

fresca de 3500 mg kg⁻¹ para o período de verão e 4500 mg kg⁻¹ para o período de inverno. O limite máximo para alface produzida em campo aberto é de 2500 mg kg⁻¹. A concentração de nitrato em espinafre não deve exceder 3000 mg kg⁻¹ no inverno e 2500 mg kg⁻¹ no verão (MAFF, 1999). O Brasil não dispõe de legislação para limites do teor de nitrato em vegetais.

Em vista dos problemas que o nitrato pode causar à saúde se consumido em excesso e devido à alta contribuição dos vegetais na ingestão diária de nitrato, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o teor de nitrato nos vegetais obtidos por diferentes sistemas de cultivo e estimar a ingestão diária de nitrato pela população. Também foi verificado o efeito da concentração de nitrato na solução nutritiva e do período sazonal no acúmulo de nitrato em alface cultivada por hidroponia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMR, A.; HADIDI, N. Effect of Cultivar and Harvest Date on Nitrate (NO₃) and Nitrite (NO₂) Content of Selected Vegetables Grown Under Open Field and Greenhouse Conditions in Jordan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 59-67, 2001.

BLOM-ZANDSTRA, M. Nitrate accumulation in vegetables and its relationship to quality. *Annals of Applied Biology*, 115, 553-561, 1989.

BOURN, D.; PRESCOTT, J. A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 1-34, 2002.

DICH, J.; JARVINEN, R.; KNEKT, P.; PENTTILA, P.L. Dietary intakes of nitrate, nitrite and NDMA in the Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey. *Food Additives and Contaminants*, 13, 541-552, 1996.

GENT, M.P.N. Growth and composition of salad greens as affected by organic compared to nitrate fertilizer and by environment in high tunnels. *Journal of Plant*

Nutrition, 25, 981-998, 2002.

GENT, M.P.N. Solution electrical conductivity and ratio of nitrate to other nutrients affect accumulation of nitrate in hydroponic lettuce. *Hortscience*, 38, 222-227, 2003.

GENTO, P.D. Contenido de nitratos en vegetales cultivados de la provincia de Valencia. *Alimentaria*, 249, 49-51, 1994.

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

LYONS, D.J.; RAYMENT, G.E.; NOBBS, P.E.; McCALLUM, L. Nitrate and nitrite in fresh vegetables from Queensland. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 64, 274-281, 1994.

MAFF. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. *Food Surveillance Information Sheet 177: Nitrate in lettuce and spinach*. United Kingdom, 1999. Disponível em <<http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1999/no177/177nitra.htm>>. Acesso em: 23 abr. 2002.

MALMAURET, L.; PARENT-MASSIN, D.; HARDY, J.L.; VERGER, P. Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Additives and Contaminants*, 19, 524-532, 2002.

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

MAYNARD, D.N.; BARKER, A.V.; MINOTTI, P.L.; PECK, N.H. Nitrate accumulation in vegetables. *Advances in Agronomy*, 28, 71-118, 1976.

McCALL, D.; WILLUMSEN, J. Effects of Nitrate, Ammonium and Chloride Application on the Yield and Nitrate Content of Soil-Grown Lettuce. *Journal of*

Horticultural Science & Biotechnology, 73, 698-703, 1998.

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

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 Chemical Toxicology*, 37, 297-305, 1999.

PÉRES-LLAMAS, F.; NAVARRO, I.; MARÍN, J.F.; MADRID, J.A.; ZAMORA, S. Estudio comparativo sobre la calidad nutritiva de alimentos procedentes de la agricultura ecológica y convencional. *Alimentaria*, 274, 39-44, 1996.

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

SIDDIQI, M.; KUMAR, R.; FAZILI, Z.; SPIEGELHALDER, B.; PREUSSMANN, R. Increased exposure to dietary amines and nitrate in a population at high risk of oesophageal and gastric cancer in Kashmir (India). *Carcinogenesis*, 13, 1331-1335, 1992.

STEINGROVER, E.G.; STEENHUIZEN, J.W.; VAN DER BOON, J. Effects of low-light intensities at night on nitrate accumulation in lettuce grown on a recirculating nutrient solution. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 41, 13-21, 1993.

STOPES, C.; WOODWARD, L.; FORDE, G.; VOGTMANN, H. Effects of composted FYM and a compound fertilizer on yield and nitrate accumulation in three summer lettuce cultivars grown in an organic system. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 27, 555-559, 1989.

VAN DER BOON, J.; STEENHUIZEN, J.W.; STEINGRÖVER, E.G. Growth and nitrate concentration of lettuce as affected by total nitrogen and chloride concentration, NH_4/NO_3 ratio and temperature of the recirculating nutrient solution. *Journal of Horticultural Science*, 65, 309-321, 1990.

WALKER, R. Naturally occurring nitrate/nitrite in foods. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 26, 1735-1742, 1975.

WALKER, R. Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: 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 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 Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, Geneva, 2003.

WOESE, K.; LANGE, D.; BOESS, C.; BÖGL, K. W. A comparison of organically and conventionally grown foods – results of a review of the relevant literature. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 74, 281-293, 1997.

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.

YORDANOV, N.D.; NOVAKOVA, E.; LUBENOVA, S. Consecutive estimation of nitrate and nitrite ions in vegetables and fruits by electron paramagnetic resonance spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 437, 131-138, 2001.

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

CAPITULO 1

CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESENÇA DE NITRATO EM VEGETAIS. UMA REVISÃO

Este trabalho será submetido para publicação na Revista Brasileira de Toxicologia.

CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESENÇA DE NITRATO EM VEGETAIS. UMA REVISÃO

RESUMO

Sais de nitrato e nitrito ocorrem naturalmente nos alimentos de origem vegetal, ou são adicionados durante o processamento de alimentos de origem animal. Nos vegetais, o nitrato se encontra naturalmente presente, visto que a planta o utiliza como fonte de nitrogênio para seu crescimento. O nível do nitrato varia de acordo com a espécie dos vegetais, do nível de nitrogênio do solo, da temperatura, da quantidade da luz solar, entre outros fatores. Embora o nitrato seja de toxicidade relativamente baixa, seu risco para a saúde humana depende da sua redução a nitrito, o qual pode conduzir à metaemoglobinemia ou formar compostos N-nitrosos. Os vegetais são uma das principais fontes de exposição dietética de nitrato, sendo responsáveis por mais de 70% da ingestão diária. Todavia, tem sido relatado que o consumo de vegetais está associado à redução do risco do câncer. O Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares estabeleceu uma ingestão diária aceitável (IDA) para nitrato de 0-3,7 mg de íon nitrato kg^{-1} de peso corpóreo e para nitrito de 0-0,07 mg de íon nitrito kg^{-1} de peso corpóreo. O presente artigo abordou estudos recentes em relação ao teor de nitrato em vegetais, assim como os aspectos toxicológicos e de legislação.

Palavras-chaves: vegetais; nitrato; nitrito.

CONSIDERATIONS ON THE PRESENCE OF NITRATE IN VEGETABLES. A REVIEW

SUMMARY

Nitrates and nitrites occur naturally in foods of vegetable origin or are added during the processing of foods of animal origin. In vegetables, nitrate is present naturally, since the plant uses it as a nitrogen source for growth. The level of nitrate varies according to the species of vegetable, the nitrogen level in the soil, the temperature and the amount of sunlight among other factors. Although nitrate has relatively low toxicity, the risk to human health depends on its reduction to nitrite, which can lead to methemoglobinemia or to the formation N-nitroso compounds. Vegetables are the main source of dietary nitrate exposure, being responsible for more than 70% of the daily ingestion. However, it has been reported that vegetable consumption is associated with a reduction in the risk of cancer. The FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) established an acceptable daily intake (ADI) for nitrate of 0-3.7 mg of ion nitrate kg^{-1} of body weight and for nitrite of 0-0.07 mg of nitrite ion kg^{-1} of body weight. The present article presents current studies in relation to the nitrate level in vegetables, as well as the toxicological and legislative aspects.

Keywords: vegetable; nitrate; nitrite.

1. INTRODUÇÃO

O nitrato está naturalmente presente no ambiente, na água e em alimentos de origem vegetal, ou é usado como aditivo alimentar, principalmente como conservante e agente antimicrobiano em queijos e produtos cárneos. Nos vegetais, o nitrato se encontra naturalmente presente, visto que a planta o utiliza como fonte de nitrogênio para seu crescimento (WALKER, 1975). O nitrato absorvido do solo pelas plantas é parcialmente convertido em nitrito pela ação enzimática da redutase do nitrato, enzima naturalmente presente nos vegetais, que permanece ativa mesmo após a colheita. Quando a planta é mantida sob condições inadequadas de armazenamento, como temperatura elevada e baixa circulação de ar, pode também ocorrer conversão de nitrato a nitrito (OLMEDO & BOSCH, 1988). Os vegetais são a principal fonte de nitrato ingerido pelo homem, principalmente os folhosos e alguns tubérculos, sendo que o teor de nitrato nesses alimentos depende de vários fatores incluindo a espécie de vegetal, intensidade luminosa, temperatura, condições de cultivo e armazenagem (MAYNARD et al., 1976).

A importância do nitrato para saúde humana está relacionada ao fato que é facilmente convertido a nitrito, o qual pode interagir com a hemoglobina afetando o transporte de oxigênio e levando a metaemoglobinemia (JAFFÉ, 1981). Nitrito, por sua vez, também reage com aminas secundárias e terciárias formando compostos N-nitrosos os quais podem estar associadas com um alto risco de câncer gástrico, hepático e de esôfago (SIDDIQI, et al., 1992), embora dietas ricas em vegetais, importantes fontes de nitrato e vitaminas, estejam sendo associadas à diminuição do risco de câncer (WHO, 1996). Ainda, estudos sugerem que nitrato pode ter efeitos benéficos no trato gastrointestinal, exercendo efeito protetor contra microrganismos patogênicos (McKNIGHT et al., 1999).

O objetivo do presente artigo de revisão foi abordar dados recentes do teor de nitrato em vegetais, assim como os aspectos toxicológicos e de legislação.

2. OCORRÊNCIA DO NITRATO NOS VEGETAIS

Nitrato e nitrito são encontrados naturalmente no solo, na água e nas plantas como consequência do ciclo do nitrogênio. Na decomposição microbiológica natural de proteínas vegetal e animal ocorre a produção de íons amônio, os quais são oxidados a nitratos e nitritos. Estes são parcialmente assimilados pelas plantas para a síntese de proteínas e o restante sofre lixiviação e desnitrificação. Bactérias desnitrificantes presentes no solo transformam parte do íon amônio em nitrogênio atmosférico, o qual pode ser fixado diretamente em compostos orgânicos de nitrogênio por algumas algas e bactérias e, indiretamente, por uma série de plantas da família das leguminosas. Em adição, a ampla utilização de fertilizantes nitrogenados na agricultura também contribui significativamente no aumento de nitratos presentes no solo e na água (TOLEDO & REYES, 1990; PURVES et al., 2001).

Nos vegetais, o nitrato se encontra naturalmente presente, visto que a planta absorve nitrato como fonte de nitrogênio para seu crescimento (WALKER, 1975). O teor de nitrato nos vegetais depende de fatores genéticos, da disponibilidade desse nutriente para a planta e de fatores ambientais, como luminosidade, temperatura e umidade relativa do ar. Em adição, a concentração de nitrato depende do horário de colheita, do sistema de cultivo, do estágio de maturação e da parte da planta. (MAYNARD et al., 1976; VAN DER BOON et al., 1990; STEINGRÖVER et al., 1993; LYONS et al., 1994; McCALL & WILLUMSEN, 1998; AMR & HADIDI, 2001; GENT, 2003).

A concentração de nitrato nos vegetais varia dentro de uma extensa faixa. Vegetais verdes folhosos tais como espinafre e alface, e raízes como rabanete e beterraba, destacam-se por acumularem elevados teores de nitrato, geralmente superiores a 1000 mg kg^{-1} do produto fresco (**Tabela 1**), enquanto que batata, cebola e tomate geralmente contêm menos que 200 mg kg^{-1} (MAFF, 1987).

Tabela 1. Teor de nitrato em vegetais.

Vegetal	Nitrato (mg kg ⁻¹)		Referência
	Média	Faixa	
Acelga	1625		GARCÍA-ROCHÉ & ILNITSKY, 1986
	2417	556-3384	GENTO, 1994
	2363	1299-4220	SANTAMARIA et al., 1999
Agrião	1928		GARCÍA-ROCHÉ & ILNITSKY, 1986
	1300		MEAH et al., 1994
	3685		JIMIDAR et al., 1995
	1364		XIMENES et al., 2000
Aipo		1000-3088	KNIGHT et al., 1987
	3151		WALKER, 1990
	1306		LYONS et al., 1994
	3924		JIMIDAR et al., 1995
	1678	1009-2163	SANTAMARIA et al., 1999
Alface		396-5735	WALKER, 1975
		46-2403	LARA & TAKAHASHI, 1982
	823		GARCÍA-ROCHÉ & ILNITSKY, 1986
		280-4027	KNIGHT et al., 1987
	2330		WALKER, 1990
	1055	578-1948	GENTO, 1994
	943		LYONS et al., 1994
		490-3000	MEAH et al., 1994
	1327		RATH et al., 1994
	2395		JIMIDAR et al., 1995
		10-3680	FORLANI et al., 1997
		445-4543	MAFF, 1999
		108-5830	PETERSEN & STOLTZE, 1999
		428-1766	SANTAMARIA et al., 1999
		337-1568	YSART et al., 1999
	1419		XIMENES et al., 2000
	570		YORDANOV et al., 2001
	804		MALMAURET et al., 2002
Beterraba	2430	247-4488	CHUNG et al., 2003
		682-8008	WALKER, 1975
		285-3069	LARA et al., 1984
	1977		GARCÍA-ROCHÉ & ILNITSKY, 1986
		2400-3010	KNIGHT et al., 1987
	3288		WALKER, 1990
	2126		LYONS et al., 1994
		224-1877	MAFF, 1998
		190-4070	PETERSEN & STOLTZE, 1999
	1727	1023-2414	SANTAMARIA et al., 1999
	1211		YSART et al., 1999
	7464		XIMENES et al., 2000

Tabela 1. (continuação)

Vegetal	Nitrato (mg kg ⁻¹)		Referência
	Média	Faixa	
Couve		30-860	WALKER, 1975
		235-4300	LARA & TAKAHASHI, 1982
	408		GARCÍA-ROCHÉ & ILNITSKY, 1986
		460-910	KNIGHT et al., 1987
	712		WALKER, 1990
	1063		LYONS et al., 1994
		160-860	MEAH et al., 1994
	674		RATH et al., 1994
		26-1523	MAFF, 1998
	400	8-929	SANTAMARIA et al., 1999
Espinafre		94-488	YSART et al., 1999
	197		YORDANOV et al., 2001
		82-3413	WALKER, 1975
		397-3017	LARA & TAKAHASHI, 1982
		1391-2321	KNIGHT et al., 1987
	2470		WALKER, 1990
	1906	376-3418	GENTO, 1994
	760		RATH et al., 1994
	3335		JIMIDAR et al., 1995
		670-1570	FORLANI et al., 1997
Rabanete		266-2834	MAFF, 1998
		470-3845	MAFF, 1999
	1845	547-3350	SANTAMARIA et al., 1999
		48-5630	PETERSEN & STOLTZE, 1999
		1272-2229	YSART et al., 1999
	527		XIMENES et al., 2000
	860		YORDANOV et al., 2001
	1591		MALMAURET et al., 2002
	4259	195-7793	CHUNG et al., 2003
		350-5067	WALKER, 1975
Rúcula	1871		GARCÍA-ROCHÉ & ILNITSKY, 1986
	2600		WALKER, 1990
	1100		MEAH et al., 1994
	2067	1117-2993	SANTAMARIA et al., 1999
	1461		XIMENES et al., 2000
	737		YORDANOV et al., 2001
	1878	766-4570	CHUNG et al., 2003
	2597	963-4305	SANTAMARIA et al., 1999
Rúcula	6300		GENT, 2002
	3705	571-6122	MARTIN & RESTANI, 2003

Os cereais e frutas frescas possuem baixos teores de nitrato, em média abaixo de 10 mg kg^{-1} , com exceção de bananas e morangos onde concentrações de 25 a 140 mg kg^{-1} foram relatadas (WALKER, 1975; 1990; LYONS et al., 1994).

Nos vegetais danificados, ou durante o armazenamento em condições inadequadas, incluindo temperatura elevada e período prolongado, há uma tendência de redução do teor de nitrato, enquanto a concentração do nitrito aumenta. A conversão de nitrato a nitrito pode ser decorrente da ação da redutase do nitrato endógena ou da presença exógena de bactérias redutoras. A refrigeração é capaz de retardar o processo, sem, contudo, impedi-lo (FLETCHER et al., 1987; OLMEDO & BOSCH, 1988). Durante o processo de cozimento do alimento também pode ocorrer diminuição do seu teor de nitrato, visto que o íon tende a se difundir para a água de cocção (OLMEDO & BOSCH, 1988; MEAH et al., 1994).

Em contraste ao nitrato, a concentração de nitrito em vegetais frescos é baixa, geralmente menor do que 2 mg kg^{-1} do produto. Vegetais fermentados ou “picles”, os quais são usados na dieta asiática, podem conter elevados teores de nitrato (acima de 500 mg kg^{-1}) e de nitrito (400 mg/kg) (HOTCHKISS et al., 1992).

3. EXPOSIÇÃO HUMANA AO NITRATO

Considera-se o nitrato como um produto de baixa toxicidade, mas nitrito e compostos N-nitrosos são biologicamente ativos nos mamíferos. Como a redução do nitrato produz nitrito e, posteriormente, compostos N-nitrosos, é importante considerar as fontes exógenas de nitrato ao corpo humano.

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, armazenamento, processamento, dieta e o preparo dos alimentos influenciam na quantidade de nitrato ingerida.

Cálculos da estimativa de ingestão variam dependendo, entre outros, da metodologia analítica utilizada para determinação de nitrato e dos dados de consumo utilizados (tipos de alimentos e inclusão ou não do teor de nitrato proveniente da água). A água com alto teor de nitrato representa uma importante fonte de exposição na ingestão diária total de nitrato.

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 (KNIGHT, et al., 1987; WALKER, 1990; MEAH et al., 1994; YSART et al., 1999; PETERSEN & STOLTZE, 1999; SANTAMARIA et al., 1999; ZHONG et al., 2002).

Na maioria das dietas, os vegetais em geral constituem a maior fonte de nitrato ingerido. Estima-se que vegetais contribuem com mais de 70% do nitrato total ingerido. Em particular, vegetais verdes folhosos têm uma maior contribuição para a exposição alimentar devido ao elevado nível de nitrato que eles possuem (DICH et al., 1996; YSART et al., 1999; PETERSEN & STOLTZE, 1999).

Um estudo de dieta total realizado no Reino Unido, baseado na determinação da concentração nos alimentos, indicou que a ingestão média de nitrato pelos consumidores foi abaixo da ingestão diária aceitável ($0-3,7 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corpóreo). Este estudo incluiu um grupo de vegetarianos os quais, provavelmente, tem maior ingestão de nitrato devido ao grande consumo de vegetais. No entanto, a quantidade de nitrato ingerido pelos vegetarianos não foi diferente daquela determinada na população em geral (WHO, 2003).

4. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

4.1. Absorção, Distribuição e Excreção

Em seres humanos, o nitrato ingerido na dieta é rapidamente absorvido na parte superior do trato digestivo e rapidamente equilibrado com os fluídos do corpo (BARTHOLOMEW & HILL, 1984; CORTAS & WAKID, 1991). Num estudo conduzido para avaliar a biodisponibilidade do nitrato em freqüentes consumidores de vegetais, vinte voluntários saudáveis receberam uma simples dose de 500 mg de NaNO_3 e 300 g de alface crua, espinafre e beterraba cozidos. A biodisponibilidade do nitrato foi de, aproximadamente, 100% (LAMBERS et al., 2000). Apesar de existir grande variabilidade entre indivíduos, em média 25% do nitrato ingerido por via oral são secretados na saliva. 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 $40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ após ingestão de baixas e altas doses de nitrato, respectivamente. Em crianças lactentes, o nível de nitrato salivar varia entre 0,1 e $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com valor médio de $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (WHO, 1996).

Em adição à saliva, nitrato também é secretado no trato gastrointestinal 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. Sabe-se que a excreção urinária de nitrato está relacionada com a quantidade do íon ingerida. Entretanto, a excreção urinária de nitrato 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^{-1} (BARTHOLOMEW & HILL, 1984).

4.2. Síntese endógena de nitrato

Em adição à exposição através da dieta, há considerável síntese endógena de nitrato em humanos (BARTHOLOMEW & HIIL, 1984). A estimativa da síntese endógena é de, aproximadamente, 62 mg/dia, 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 (WHO, 1996). Entretanto, a principal rota metabólica para a síntese endógena de nitrato é a conversão de arginina, por macrófagos, a óxido nítrico (NO), seguido de oxidação a anidrido nitroso e reação deste em água para produzir nitrito, o qual é rapidamente oxidado a nitrato pela reação com hemoglobina (GANGOLLI et al., 1994; WALKER, 1996).

4.3. Biotransformação

No homem, e provavelmente na maioria das espécies animais, o nitrato secretado pelas glândulas salivares é reduzido a nitrito por bactérias anaeróbias facultativas presentes na superfície da língua (McKNIGHT et al., 1999). Aproximadamente 5% do nitrato ingerido é convertido a nitrito, o que representa a principal fonte de nitrito para o homem (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, níveis elevados de nitrito associados a valores elevados de pH gástrico, têm sido observados em indivíduos aclorídricos, pacientes com úlcera gástrica, câncer do estômago, atrofia gástrica, assim como naqueles tratados com cimetidina e antiácidos (BARTSCH & MONTESANO, 1984). Crianças com menos de 3 meses de idade são altamente susceptíveis à redução bacteriana do nitrato 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 (WHO, 1996).

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

4.4. Efeitos do nitrato em humanos

4.4.1. Metaemoglobinemia infantil

O mais importante efeito tóxico agudo como consequência da ingestão de nitrato decorre da sua conversão a nitrito e formação de metaemoglobina (MetHb). O nitrito absorvido oxida o Fe (II) da hemoglobina (Hb) a Fe (III), resultando a MetHb, a qual não se liga reversivelmente ao oxigênio, como acontece com a hemoglobina. Portanto, ocorre uma redução no transporte do oxigênio dos alvéolos pulmonares para os tecidos (JAFFÉ, 1981). Quando os níveis de exposição ao nitrito são baixos, a formação de MetHb é reversível, sendo catalisada pela enzima NADH MetHb-redutase. Quando o nível de exposição é elevado, o sistema de redução é saturado, resultando em um aumento da concentração de MetHb no sangue. Níveis de MetHb de 10% produzem cianose assintomática, enquanto níveis de 20 a 50% levam à cianose com sintomas de hipoxia, dispnéia, dores de cabeça, taquicardia e perda da consciência. A concentração letal de MetHb não é conhecida, mas níveis superiores a 50% podem provocar a morte (WHO, 1978; BORONAT et al., 1982).

Crianças com menos de três meses de idade são mais susceptíveis a desenvolverem metaemoglobinemia devido a vários fatores: (1) possuem baixa acidez gástrica, o que favorece o crescimento de microrganismos que reduzem o

nitrato a nitrito; (2) apresentam deficiência fisiológica transitória da MetHb 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 MetHb-redutase (WHO, 1978; JAFFÉ, 1981; McKNIGHT et al., 1999).

A maioria dos casos de metaemoglobinemia em crianças é associada ao consumo água de poço contendo altas concentrações de nitrato (teores acima de 44,3 mg L⁻¹), freqüentemente contaminada por bactérias, as quais reduzem o nitrato a nitrito (WHO, 1996). Têm sido também relatados casos de metaemoglobinemia em bebês que consumiram beterraba, cenoura e purê de espinafre, preparados em casa e armazenados em condições inadequadas (COMMITTEE ON NUTRITION, 1970; SWANN, 1975; DUSDIEKER, 1994; ECHANIZ, 2001).

4.4.2. Carcinogenicidade

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 (MAGEE & BARNES, 1956; 1967; REYES & SCANLAN, 1984; WALKER, 1990).

Os compostos N-nitrosos podem ser formados pela reação do nitrito com aminas secundárias ou terciárias, em meio ácido (MIRVISH, 1975). Esta reação foi proposta há mais de 30 anos e tem sido estudada extensivamente por várias maneiras: incubação *in vitro* de precursores sob condições oral e gástrica simuladas, análises de saliva e conteúdo gástrico após administração de precursores, determinação de compostos N-nitrosos específicos ou totais nos fluídos do corpo ou fezes após tratamento com precursores e estudos de carcinogenicidade após co-administração de nitrato e nitrito e aminas ou amidas (WALKER, 1990). 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 a partir do nitrato por bactérias contaminantes, e aminas e amidas presentes no mesmo alimento (VITTOZZI, 1992).

Estudos epidemiológicos sugerem que a alta ingestão de agentes nitrosantes e a formação intragástrica de N-nitrosaminas podem estar associadas com um alto risco de câncer gástrico, hepático e de esôfago (SIDDIQI, et al., 1992; WU et al., 1993; STEFANI et al., 1998; MITACEK et al., 1999; KIM et al., 2002). Por outro lado, evidência indireta indica, através de estudos epidemiológicos ou nutricionais, que dietas ricas em vegetais, embora importantes fontes de nitrato, são associadas com a diminuição do risco de câncer (WHO, 1996). Fatores protetores, tais como ácido ascórbico e α -tocoferol, presentes nestes alimentos são conhecidos como inibidores da formação de compostos N-nitrosos (MIRVISH, 1994; TERRY et al., 2001).

Embora não existam evidências diretas da incidência de câncer em humanos como resultado da exposição a nitrosaminas, presume-se que o homem também seja sensível à ação tóxica desses compostos. Esta observação não é válida para o nitrato, o qual não é carcinogênico (McKNIGHT et al., 1999).

4.5. Limites toxicológicos e de resíduos

O Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA), em sua 59^a Reunião, reavaliou os limites da ingestão diária aceitável (IDA) para os íons nitrito e nitrato, com base nos últimos estudos toxicológicos existentes. 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 concluiu que os efeitos tóxicos mais relevantes do nitrito são:

- a) metaemoglobinemia em neonatos e em indivíduos com deficiência congênita da metaemoglobina-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 mg kg⁻¹ de peso corpóreo, expresso como íon nitrito (WHO, 2003). Para o nitrato, o Comitê manteve a IDA de 0-3,7 mg kg⁻¹ de peso corpóreo, expresso como íon nitrato, a qual tinha sido estabelecida na sua 44^a reunião (WHO, 1996).

Em vista dos altos teores de nitrato em vegetais, principalmente os verdes folhosos, a Comunidade Européia estabeleceu como limite máximo permitido para alface produzida em casa de vegetação, teores de nitrato na massa de matéria fresca de 3500 mg kg⁻¹ para o período de verão e 4500 mg kg⁻¹ para o período de inverno. O limite máximo para alface produzida em campo aberto é de 2500 mg kg⁻¹. A concentração de nitrato em espinafre não deve exceder 3000 mg kg⁻¹ no inverno e 2500 mg kg⁻¹ no verão (MAFF, 1999). Cabe ressaltar que o Brasil não dispõe de legislação para limites do teor de nitrato em vegetais.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vegetais, principalmente os folhosos, constituem a principal fonte de ingestão diária de nitrato pela população. A toxicidade do nitrato está relacionada com sua redução a nitrito, sendo que os principais efeitos tóxicos associados a exposição a esse íon são hipertrofia da zona adrenal glomerulosa em ratos, metaemoglobinemia, principalmente em crianças, e formação de compostos N-nitrosos, os quais são substâncias carcinogênicas. Entretanto, dietas ricas em vegetais são associadas com a diminuição do risco de câncer, visto que fatores protetores, tais como ácido ascórbico e α -tocoferol, presentes nestes alimentos, atuam como inibidores da formação dos compostos N-nitrosos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMR, A.; HADIDI, N. Effect of Cultivar and Harvest Date on Nitrate (NO₃) and Nitrite (NO₂) Content of Selected Vegetables Grown Under Open Field and Greenhouse Conditions in Jordan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 59-67, 2001.
- BARTHOLOMEW, B.; HILL, M.J. The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Food and Chemical Toxicology*, 22, 789-795, 1984.
- BARTSCH, H.; MONTESANO, R. Relevance os nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis*, 5, 1381-1393, 1984.
- 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.
- CHUNG, S.Y.; KIM, J.S.; KIM, M.; HONG, M.K.; LEE, J.O.; KIM, C.M.; SONG, I.S. Survey of nitrate and nitrite contents of vegetables grown in Korea. *Food Additives and Contaminants*, 20, 621-628, 2003.
- COMMITTEE ON NUTRITION. Infant methemoglobinemia: the role of dietary nitrate. *Pediatrics*, 46, 475-478, 1970.
- CORTAS, N.K.; WAKID, N.W. Pharmacokinetics aspects of inorganic nitrate ingestion in man. *Pharmacology and Toxicology*, 68, 192-193, 1991.
- DICH, J.; JARVINEN, R.; KNEKT, P.; PENTTILA, P.L. Dietary intakes of nitrate, nitrite and NDMA in the Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey. *Food Additives and Contaminants*, 13, 541-552, 1996.
- DUSDIEKER, L.B.; GETCHELL, J.P.; LIARAKOS, T.M.; HAUSLER, W.J.; DUNGY, C.I. Nitrate in Baby Foods: Adding to the Nitrate Mosaic. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 148, 490-494, 1994.
- ECHANIZ, J.S.; FERNANDEZ, J.B.; RASO, S.M. Methemoglobinemia and consumption of vegetables in infants. *Pediatrics*, 107, 1024-1028, 2001.

FLETCHER, J. R.; LAW, S.J.; WALTERS, A.H. Effect of cooking on the nitrate levels in vegetable. *Nutrition and Health*, 5, 61-63, 1987.

FORLANI, L.; GRILLENZONI, S.; ORI, E.; RESCA, P. Nitrate levels in vegetables that may be eaten raw. *Italian Journal of Food Science*, 1, 65-69, 1997.

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 Phamacology. Environmental Toxicology and Pharmacology Section*, 292, 1-38, 1994.

GARCÍA-ROCHÉ, M.O.; ILNITSKY, A. Contenido de Nitrato en Productos Vegetales Cubanos en Relación a la Ingestión de Nitratos por la Población. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 26, 115-122, 1986.

GENT, M.P.N. Growth and composition of salad greens as affected by organic compared to nitrate fertilizer and by environment in high tunnels. *Journal of Plant Nutrition*, 25, 981-998, 2002.

GENT, M.P.N. Solution eletrical conductivity and ratio of nitrate to other nutirents affect accumulation of nitrate in hydroponic lettuce. *Hortscience*, 38, 222-227, 2003.

GENTO, P.D. Contenido de nitratos en vegetales cultivados de la provincia de Valencia. *Alimentaria*, 249, 49-51, 1994.

HOTCHKISS, J.H.; HELSER, M.A.; MARAGOS, C.M.; WENG, Y.M. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. Food Safety and Biological Implications. ASC Symposium Series 484, Washington, DC, American Chemical Society, 1992.

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

JIMIDAR, M.; HARTMANN, C.; COUSEMENT, N.; MASSART, D.L. Determination of nitrate and nitrite in vegetables by capillary electrophoresis with indirect detection. *Journal of Chromatography A*, 706, 479-492, 1995.

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

KNIGHT, T.M.; FORMAN, D.; AL-DABBAGH, S.A.; DOLL, R. Estimation of Dietary Intake of Nitrate and Nitrite in Great Britain. *Food and Chemical Toxicology*, 25, 277-285, 1987.

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

LAMBERS, A.C.; KORTBOYER, J.M.; SCHOTHORST, R.C.; SIPS, A.J.A.M.; CLEVEN, R.F.M.J.; MEULENBELT, J. The oral bioavailability of nitrate from vegetables investigated in healthy volunteers. National Institute of Public Health and the Environment, Report No. 235802014, Bilthoven, Netherlands, 2000. 73 p.

LARA, W.H.; TAKAHASHI, M.Y. Níveis de nitrato em hortaliças. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 42, 53-57, 1982.

LARA, W.H.; TAKAHASHI, M.Y.; YABIKU, H.Y. Níveis de nitrato em beterraba. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 44, 109-113, 1984.

LYONS, D.J.; RAYMENT, G.E.; NOBBS, P.E.; McCALLUM, L. Nitrate and nitrite in fresh vegetables from Queensland. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 64, 274-281, 1994.

MAFF. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. *Nitrate, Nitrite and n-Nitroso Compounds in Food*. Food Surveillance Paper No. 20. London: H. M. Stationery Office, 1987.

MAFF. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. *Food Surveillance Information Sheet 158: Nitrate in vegetables*. United Kingdom, 1998. Disponível em <<http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1998/no158/158nitra.htm>>. Acesso em: 23 abr. 2002.

MAFF. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. *Food Surveillance Information Sheet 177: Nitrate in lettuce and spinach*. United Kingdom, 1999. Disponível em <<http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1999/no177/177nitra.htm>>. Acesso em: 23 abr. 2002.

MAGEE, P.N.; BARNES, J.M. Carcinogenic N-nitroso compounds. *Advances in Cancer Research*, 10, 164-246, 1967.

MAGEE, P.N.; BARNES, J.M. The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *British Journal of Cancer*, 10, 114-122, 1956.

MALMAURET, L.; PARENT-MASSIN, D.; HARDY, J.L.; VERGER, P. Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Additives and Contaminants*, 19, 524-532, 2002.

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

MAYNARD, D.N.; BARKER, A.V.; MINOTTI, P.L.; PECK, N.H. Nitrate accumulation in vegetables. *Advances in Agronomy*, 28, 71-118, 1976.

McCALL, D.; WILLUMSEN, J. Effects of Nitrate, Ammonium and Chloride Application on the Yield and Nitrate Content of Soil-Grown Lettuce. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 73, 698-703, 1998.

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.

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

MEAH, M.N.; HARRISON, N.; DAVIES, A. Nitrate and nitrite in foods and the diet.

Food Additives and Contaminants, 11, 519-532, 1994.

MIRVISH, S.S. Formation of Nitroso Compounds: Chemistry, kinetics, and *in vivo* occurrence. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 31, 325-351, 1975.

MIRVISH, S.S. Experimental Evidence for Inhibition of *N*-Nitroso Compound Formation as a Factor in the Negative Correlation between Vitamin C Consumption and the Incidence of Certain Cancers. *Cancer Research (Suppl.)*, 54, 1948s-1951s, 1994.

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 Chemical Toxicology*, 37, 297-305, 1999.

OLMEDO, R.G.; BOSCH, N.B. Aspectos toxicológicos de la presencia de nitratos y nitritos en los productos hortícolas cocidos y en su agua de cocción. *Alimentaria*, 25, 71-75, 1988.

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

PURVES, W.K.; SADAVA, D.; ORIAN, G.H.; HELLER, H.C. *Life, The Science of Biology*, 6. ed. Sinauer e Freeman, Massachusetts, USA, 2001. 1044 p.

RATH, S.; XIMENES, M.I.N.; REYES, F.G.R. Determinação de nitrato e nitrito em vegetais produzidos no Distrito Federal: um estudo preliminar. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 54, 126-130, 1994.

REYES, F.G.R.; SCANLAN, R.A. *N*-nitrosaminas: Formação e ocorrência em alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 18, 299-309, 1984.

SANTAMARIA, P.; ELIA, A.; SERIO, F.; TODARO, E. A survey of nitrate and oxalate in fresh vegetables. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 79, 1882-1888, 1999.

SIDDIQI, M.; KUMAR, R.; FAZILI, Z.; SPIEGELHALDER, B.; PREUSSMANN, R. Increased exposure to dietary amines and nitrate in a population at high risk of oesophageal and gastric cancer in Kashmir (India). *Carcinogenesis*, 13, 1331-1335, 1992.

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.

STEINGROVER, E.G.; STEENHUIZEN, J.W.; VAN DER BOON, J. Effects of low-light intensities at night on nitrate accumulation in lettuce grown on a recirculating nutrient solution. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 41, 13-21, 1993.

SWANN, P.F. The Toxicology of Nitrate, Nitrite and N-nitroso Compounds. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 26, 1761-1770, 1975.

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.

TOLEDO, M.C.F.; REYES, F.G.R. Nitrato e nitrito: presença em alimentos e risco de sua ingestão. *Revista de Nutrição da PUCCAMP*, 3, 21-41, 1990.

VAN DER BOON, J.; STEENHUIZEN, J.W.; STEINGRÖVER, E.G. Growth and nitrate concentration of lettuce as affected by total nitrogen and chloride concentration, NH_4/NO_3 ratio and temperature of the recirculating nutrient solution. *Journal of Horticultural Science*, 65, 309-321, 1990.

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

WALKER, R. Naturally occurring nitrate/nitrite in foods. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 26, 1735-1742, 1975.

WALKER, R. Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: 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. Environmental Health Criteria n° 5. *Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds*. Geneva, World Health Organization, 1978.
- 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 Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, 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.
- YORDANOV, N.D.; NOVAKOVA, E.; LUBENOVA, S. Consecutive estimation of nitrate and nitrite ions in vegetables and fruits by electron paramagnetic resonance spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 437, 131-138, 2001.
- YSART, G.; MILLER, P.; BARRETT, G.; FARRINGTON, D.; LAWRENCE, P.; HARRISON, N. Dietary exposures to nitrate in the UK. *Food Additives and Contaminants*, 16, 521-532, 1999.

CAPITULO 2

AVALIAÇÃO DO TEOR DE NITRATO EM HORTALIÇAS FOLHOSAS PRODUZIDAS POR DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO

Este trabalho será submetido para publicação na Revista Alimentaria.

AVALIAÇÃO DO TEOR DE NITRATO EM HORTALIÇAS FOLHOSAS PRODUZIDAS POR DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO

RESUMO

O nitrato está naturalmente presente nos vegetais como fonte de nitrogênio para seu crescimento, sendo que seu teor depende de fatores genéticos, da disponibilidade desse nutriente para a planta e de fatores ambientais. Estima-se que mais de 70% do nitrato ingerido diariamente pelo homem são fornecidos pelos vegetais. O presente trabalho avaliou o teor de nitrato em hortaliças folhosas (agrião, alface e rúcula) produzidos por diferentes sistemas de cultivo (convencional, orgânico e hidropônico) e estimou a ingestão diária de nitrato proveniente da ingestão dessas hortaliças, pela população. A amostragem foi realizada no período de Junho/2001 a Fevereiro/2003, sendo que as hortaliças foram adquiridas junto aos produtores, em feiras e em supermercados da região de Campinas, São Paulo. A extração do nitrato das amostras seguiu o procedimento recomendado pela AOAC. O método utilizado para a determinação foi análise por injeção em fluxo (FIA), com detecção espectrofotométrica do complexo ternário FeSCNNO^+ em 460 nm. Foi verificada diferença ($P < 0,05$) entre os três sistemas de cultivos, quanto ao teor médio de nitrato em alface e rúcula, sendo que no orgânico foi inferior ao do cultivo convencional, e este inferior ao do hidropônico. Para as amostras de agrião não foi verificada diferença ($P < 0,05$) entre os cultivos orgânico e hidropônico, os quais apresentaram teor de nitrato superior ($P < 0,05$) ao das amostras cultivadas convencionalmente. O teor de nitrato para cada espécie vegetal variou entre produtores, em diferentes partes da planta e com relação ao período sazonal. A ingestão diária máxima de nitrato calculada a partir do consumo das hortaliças estudadas, representa cerca de 8,6% do valor de ingestão diária aceitável (IDA) estabelecida para este íon.

Palavras-chaves: hortaliças folhosas; nitrato; sistema de cultivo.

EVALUATION OF THE NITRATE CONTENT IN LEAF VEGETABLES PRODUCED THROUGH DIFFERENT CULTIVATION SYSTEMS

SUMMARY

Nitrate is naturally present in vegetables as a nitrogen source for their growth, the amount depending on genetic factors, the availability of this nutrient for the plant and environmental factors. It has been estimated that more than 70% of the nitrate ingested daily by man is supplied by vegetables. The present work evaluated the nitrate content in leafy vegetables (watercress, lettuce and arugula) produced by different systems of cultivation (conventional, organic and hydroponic). The daily nitrate ingestion from the consumption of these vegetables by the population was also evaluated. Sampling was carried out during the period from June/2001 to February/2003, the vegetables being acquired directly from producers, from markets and supermarkets from Campinas, São Paulo. Nitrate was extracted from the samples using the procedure recommended by AOAC. A flow injection analysis (FIA) spectrophotometric method was used for the nitrate determination of the ternary complex FeSCNNO^+ at 460 nm. A difference was verified ($P < 0.05$) amongst the three systems of cultivation for the average nitrate content in lettuce and arugula, the level found in the organic system being lower than that in conventional culture which in turn, was lower than that in the hydroponic system. For the watercress samples no difference ($P < 0.05$) was found between the organic and hydroponic cultivated samples, both presenting higher nitrate contents ($P < 0.05$) than the conventionally cultivated samples. The nitrate content for each vegetable species varied between producers, between different parts of the plant and in relation to the season. The maximum daily nitrate intake calculated from the consumption of the vegetables under study, represented about 8.6% of the value for the acceptable daily intake (ADI) established for this ion.

Keywords: leafy vegetable; nitrate; cultivation system.

1. INTRODUÇÃO

Nitrato e nitrito são encontrados naturalmente no solo, na água e nas plantas como consequência do ciclo do nitrogênio. Nitrato está naturalmente presente nos vegetais visto que a planta o utiliza como fonte de nitrogênio para seu crescimento (WALKER, 1975).

A concentração de nitrato nos vegetais varia de acordo com a espécie, da disponibilidade desse nutriente para a planta e de fatores ambientais, tais como intensidade luminosa e temperatura. Em adição, o teor de nitrato depende do horário de colheita, do sistema de cultivo, do estágio de maturação e da parte da planta. (MAYNARD et al., 1976; VAN DER BOON et al., 1990; STEINGRÖVER et al., 1993; LYONS et al., 1994; McCALL & WILLUMSEN, 1998; AMR & HADIDI, 2001).

Na agricultura convencional os vegetais são cultivados em solo com adequado suprimento de nutrientes e água. Para obtenção de uma boa produção muitas vezes são empregadas substâncias químicas, tais como fertilizantes minerais e praguicidas para o controle de pragas.

O sistema de produção orgânico dispensa o emprego de insumos químicos, como fertilizantes e praguicidas. Ainda, adota a prática de rotação de cultivos, reciclagem de resíduos orgânicos, rochas minerais, manejo e controle biológico. Nesta técnica de cultivo, procura-se manter a fertilidade e a vida microbiana do solo para suprir a nutrição das plantas e sua sanidade. A produção orgânica tem uma grande vantagem sobre a agricultura convencional devido a seu impacto benéfico sobre o ambiente e na saúde humana (PENTEADO, 2000).

A hidroponia é um sistema de cultivo de plantas na água, na ausência de terra, onde os nutrientes necessários para o crescimento da planta são fornecidos através da água, por uma solução de nutrientes (RESH, 1995; TEIXEIRA, 1996). As grandes vantagens da hidroponia são a produção de vegetais homogêneos e de boa qualidade, antecipação de colheita, redução no aparecimento de pragas e/ou doenças e a produção em qualquer época do ano

(BLISKA & HONÓRIO, 1995).

O emprego de fertilizantes químicos nitrogenados usualmente utilizados no cultivo convencional e hidropônico pode levar ao acúmulo de nitrato em alguns vegetais (LYONS et al., 1994). Vários estudos indicam que vegetais cultivados pelo método convencional apresentam um maior teor de nitrato quando comparado com os cultivados pela agricultura orgânica (WOESE et al., 1997).

Na maioria das dietas, os vegetais em geral contribuem com mais de 70% do nitrato total ingerido. Em particular, vegetais verdes folhosos têm uma maior contribuição para a exposição alimentar devido à alta concentração de nitrato presente.

O teor de nitrato em alimentos, especialmente em vegetais, e sua alta ingestão é de grande interesse devido aos possíveis efeitos adversos à saúde humana. Nitrato é facilmente convertido a nitrito, o qual pode interagir com a hemoglobina afetando o transporte de oxigênio levando a metaemoglobinemia. Nitrito também reage com aminas secundárias e terciárias formando compostos N-nitrosos (WALKER, 1990), os quais podem estar associadas com um alto risco de câncer gástrico, hepático e de esôfago (SIDDIQI, et al., 1992; WU et al., 1993; MITACEK et al., 1999; KIM et al., 2002), embora dietas ricas em saladas e vegetais, importantes fontes de nitrato e vitaminas, estejam associadas à diminuição do risco de câncer (WHO, 1996).

Considera-se o íon nitrato de baixa toxicidade, mas quando reduzido a nitrito pode representar um alto risco à saúde. Assim, o Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) estabeleceu valores de ingestão diária aceitável (IDA) para nitrato e nitrito de 0-3,7 mg de íon nitrato kg^{-1} de peso corpóreo e de 0-0,07 mg de íon nitrito kg^{-1} de peso corpóreo, respectivamente (WHO 2003).

A Comunidade Européia estabelece como limite máximo permitido para alface produzida em casa de vegetação, teores de nitrato na massa de matéria fresca de 3500 mg kg^{-1} para o período de verão e 4500 mg kg^{-1} para o período de inverno. O limite máximo para alface produzida em campo aberto é de

2500 mg kg⁻¹. A concentração de nitrato em espinafre não deve exceder 3000 mg kg⁻¹ no inverno e 2500 mg kg⁻¹ no verão (MAFF, 1999). Cabe ressaltar que o Brasil não dispõe de legislação para limites do teor de nitrato em vegetais.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o teor de nitrato em agrião, alface e rúcula, produzidos na região de Campinas, São Paulo, por diferentes sistemas de cultivo (orgânico, convencional e hidropônico), provenientes de diferentes produtores e cultivados em diferentes épocas do ano, assim como estimar a ingestão diária de nitrato proveniente do consumo desses vegetais pela população.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Sistema FIA

Sistema FIA (análise por injeção em fluxo) constituído de: bomba peristáltica de quatro canais Ismatec, tubos de tygon (1,2 mm d.i.), injetor proporcional de duas seções de comutação construído em acrílico, tubos de polietileno com diâmetro de 1,2 mm, espectrofotômetro Femto 432, provido de cela de fluxo de vidro, com 10 mm de caminho ótico e registrador Intralab.

2.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau p.a. As soluções foram preparadas com água desionizada.

A solução padrão de nitrato de concentração 100 mg L⁻¹ foi preparada a partir da dissolução de 0,1371 g de nitrato de sódio (Merck) em 1000 mL de água.

A solução básica (R1), pH 8,5, foi obtida a partir da dissolução de

100 g de cloreto de amônio, 20 g de tetraborato de sódio e 1 g de Na₂EDTA em 1000 mL de água. A solução de ferro na concentração de $6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (R2) foi preparada pela dissolução de sulfato ferroso amoniacal em 0,06 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico. A solução de tiocianato de potássio na concentração de 0,4 mol L⁻¹ (R3) foi obtida pela dissolução do sal em água.

2.3. Amostras

Foram analisadas amostras de agrião (*Nasturtium officinale*), alface (*Lactuca sativa* L.) e rúcula (*Eruca sativa* L.) produzidas por sistema de cultivo orgânico, convencional e hidropônico, sendo que o número de amostras coletadas em cada produtor está apresentado na **Tabela 1**.

Todas as amostras orgânicas analisadas possuíam o selo de certificação pela Associação de Agricultura Natural de Campinas (ANC) ou pela Fundação Mokiti Okada (FMO). A amostragem aleatória foi realizada no período de Junho/2001 a Fevereiro/2003, sendo que as amostras de cada vegetal foram adquiridas junto ao produtor, em feiras ou em supermercados da região de Campinas.

Tabela 1. Número de amostras dos vegetais analisados por produtor nos distintos sistemas de cultivo.

Vegetal	Sistema de cultivo	Produtor	n
Agrião	Orgânico	1	15
	Convencional	1	1
		2	1
		3	4
	Hidropônico	1	4
		2	5
		3	5
		4	8
Alface	Orgânico	1	12
		2	2
		3	3
		4	4
	Convencional	1	16
		2	5
		3	3
	Hidropônico	1	7
		2	13
		3	5
		4	5
		5	5
		6	2
Rúcula	Orgânico	1	13
		2	3
	Convencional	1	5
		2	5
		3	9
	Hidropônico	1	5
		2	5
		3	5
		4	3
Total		-	178

n: número de amostras.

2.4. Preparo das amostras

As partes comestíveis de alface, agrião e rúcula foram lavadas em água corrente, secas com papel absorvente e trituradas em liquidificador com água na proporção de 1:1 (m/m) até a obtenção de uma massa homogênea. Foram pesadas, aproximadamente, 5,00 g da massa homogênea e as amostras processadas foram mantidas em -18 °C até a realização das análises.

2.5. Método de análise

2.5.1. Extração do nitrato da matriz

A extração do nitrato da matriz vegetal foi realizada em meio aquoso a 70 °C. Aos 5,00 g da amostra foram adicionados 40 mL de água desionizada a 70 °C e a solução foi mantida por 15 minutos em banho-maria. A amostra foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, seu volume completado com água desionizada. Em seguida a solução foi filtrada em papel de filtro qualitativo Whatman.

2.5.2. Quantificação do nitrato

O nitrato presente no extrato obtido em 2.5.1 foi determinado por análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção espectrofotométrica, conforme descrito por Andrade et al. (2003). Para cada determinação foram realizadas três replicatas. O diagrama do sistema FIA empregado para a determinação de nitrato está apresentado na **Figura 1**.

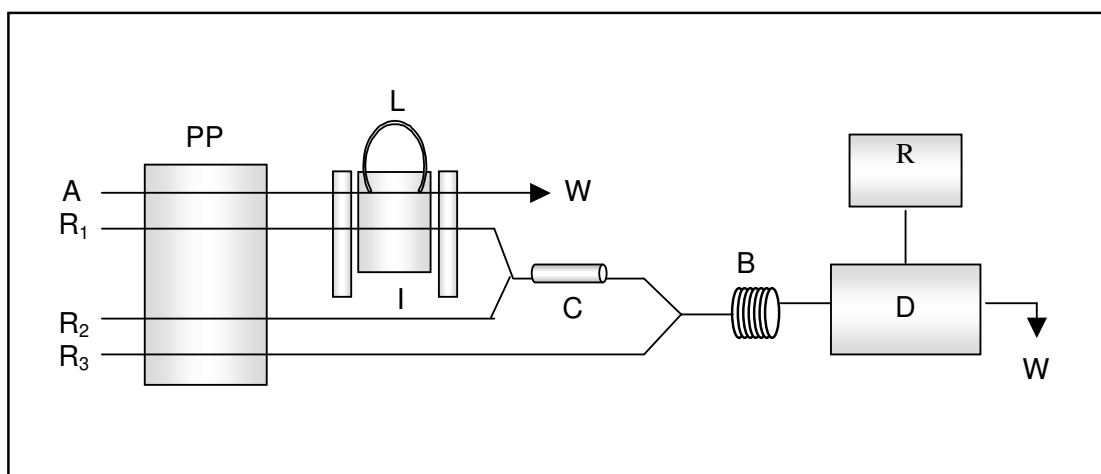


Figura 1. Sistema FIA para a determinação de nitrato. A: amostra; R₁: NH₄Cl + Na₂B₄O₇ + Na₂EDTA, 0,01% v/v, pH 8,5 (1,2 mL min⁻¹); R₂: 6x10⁻⁴ mol L⁻¹ de Fe²⁺ em 6x10⁻² mol L⁻¹ de H₂SO₄ (1,2 mL min⁻¹); R₃: 0,4 mol L⁻¹ de SCN⁻ (1,2 mL min⁻¹); PP: bomba peristáltica; I: injetor proporcional; L: alça de amostragem (300 µL); B: bobina de reação (100 cm); C: coluna de cádmio cuperizado (75 mm x 3 mm); D: detetor (λ 640 nm); R: registrador e W: descarte.

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 0,1 mol L⁻¹ EDTA (VAN STADEN, 1982). O cádmio cuperizado foi introduzido em uma coluna de vidro (7,5 cm x 3 mm d.i.), cujas extremidades foram fechadas com lã de vidro. Antes do uso, a coluna de cádmio cuperizado foi ativada mediante percolação de 100 mL da solução R₁ e 50 mL da solução 100 mg L⁻¹ de nitrato, em uma vazão de 1,2 mL min⁻¹ (GABRIEL et al., 1998). A coluna era reativada, quando a intensidade do sinal analítico (absorbância) diminuía cerca de 5%, passando pela coluna, em uma vazão de 1,2 mL min⁻¹, uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ por 5 minutos, seguida da percolação de água desionizada por 5 minutos para lavagem, e solução R₁ durante 5 minutos, para estabilização da coluna.

2.5.3. Curva analítica

Para obter a curva analítica foram empregadas soluções padrão nas seguintes concentrações: 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00; e 10,0 mg L⁻¹, preparadas pela diluição de uma solução estoque contendo 100 mg L⁻¹ de nitrato de sódio (Merck) em água desionizada.

2.6. Análise estatística

O número de amostras (n) analisadas para cada cultivar foi estabelecido através da seguinte equação:

$$400 [(máx.-mín.)/6]/(máx.+mín./2)]^2 \leq n \leq 400 [(máx.-mín.)/4]/(máx.+mín./2)]^2.$$

Onde, máx: teor de nitrato máximo e mín: teor de nitrato mínimo, determinado nas amostras (Cochran, 1977).

Para estabelecer os valores máx. e mín., foram analisadas amostras (5 a 10) de cada cultivar (agrião, alface e rúcula) obtidas de um único produtor. Assim, o número mínimo calculado de amostras a serem analisadas foi de 03 amostras para cada produtor.

A comparação entre o teor de nitrato nas hortaliças produzidas por diferentes sistemas de cultivo (orgânico, convencional e hidropônico), provenientes de diferentes produtores e cultivados em diferentes épocas do ano foi realizada por análise de variância e teste *t*. Os testes estatísticos foram realizados através do programa GraphPad Software Prism (versão 2.01).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Método de análise

O método de análise baseia-se na determinação do nitrato através do complexo ternário FeSCNNO^+ , formado a partir de NO , Fe^{2+} e SCN^- em meio ácido, utilizando um sistema FIA. O NO é gerado em duas etapas: (i) redução do nitrato a nitrito em coluna de cádmio esponjoso e (ii) redução do nitrito a NO em meio de ácido sulfúrico (ANDRADE et al., 2003).

O método FIA utilizado para quantificação de nitrato nas diferentes hortaliças (agrião, alface e rúcula) foi validado através da avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, repetibilidade, limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), recuperação em dois níveis de fortificação (30 e 60%), os quais estão apresentados nas **Tabelas 2 e 3**.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados a partir da curva analítica, sendo $\text{LOD} = 3 s_{y/x} m^{-1}$ e $\text{LOQ} = 10 s_{y/x} m^{-1}$, onde $s_{y/x}$: estimativa do desvio padrão da curva analítica e m : coeficiente angular da curva analítica (MILLER & MILLER, 1993).

Tabela 2. Parâmetro de validação para o método FIA.

Parâmetros	
Faixa linear (mg L^{-1})	5,0 – 10,0
Linearidade	0,9993
Sensibilidade (unidades de absorbância L mg^{-1})	0,093
Limite de detecção (mg kg^{-1}) ^a	6,0
Limite de quantificação (mg kg^{-1}) ^a	20,0
Repetibilidade (% RSD, n=10)	0,6

^a massa da amostra: 5,00 g

Tabela 3. Porcentagem de recuperação de nitrato nas amostras estudadas, em níveis de fortificação de 30 e 60%.

Vegetal	Recuperação média (%)	
	30	60
Alface	86	95
Agrião	83	92
Rúcula	112	94

Os parâmetros de validação avaliados indicam que o método é adequado para o monitoramento de nitrato em hortaliças folhosas, além de apresentar as seguintes vantagens em relação ao método espectrofotométrico recomendado pela AOAC (AOAC, 1997): emprego de reagentes não carcinogênicos, baixo consumo de reagentes e elevada frequência analítica (30 determinações h^{-1} , após obtenção do extrato).

3.2. Determinação do teor de nitrato em hortaliças folhosas

O teor de nitrato encontrado nas amostras de agrião, alface e rúcula procedentes de diferentes sistemas de cultivo, estão apresentados na **Tabela 4**. A escolha dessas hortaliças foi devido a sua disponibilidade nesses três sistemas de cultivo.

O teor de nitrato nas espécies analisadas variou de 115 a 9703 mg kg^{-1} , sendo que agrião e rúcula apresentaram maiores teores.

Segundo a análise de variância dos resultados, foi verificada diferença ($P < 0,05$) entre os três métodos de cultivo para alface e rúcula, sendo que as cultivadas pela agricultura orgânica apresentaram teor médio de nitrato inferior ao das provenientes do cultivo convencional, e este inferior ao das cultivadas por hidroponia. Estes resultados estão de acordo com aqueles relatados por Miyazawa et al. (2001).

Para as amostras de agrião, não foi verificada diferença ($P<0,05$) entre os cultivos orgânico e hidropônico, sendo que o teor de nitrato presente nas amostras provenientes destes cultivos foi superior ($P<0,05$) ao das cultivadas convencionalmente.

O teor médio de nitrato presente nas amostras de alface foi abaixo do limites estabelecidos pela Comunidade Européia. Com relação às amostras de agrião e rúcula, não há legislação para o teor máximo de nitrato.

Tabela 4. Teor de nitrato em agrião, alface e rúcula procedentes de diferentes sistemas de cultivo.

Vegetal	Tipo de cultivo	Teor de NO_3 (mg kg^{-1})		
		N	Média $\pm$ s (mg kg^{-1})	Faixa (mg kg^{-1})
Agrião	Orgânico	15	5180 ^a $\pm$ 689	3340 - 5926
	Convencional	6	1234 ^b $\pm$ 738	296 - 2388
	Hidropônico	22	4873 ^a $\pm$ 874	2009 - 6160
Alface	Orgânico	21	818 ^a $\pm$ 489	115 - 1852
	Convencional	24	1303 ^b $\pm$ 430	677 - 2179
	Hidropônico	37	2983 ^c $\pm$ 554	1842 - 4022
Rúcula	Orgânico	16	4073 ^a $\pm$ 1260	2160 - 5670
	Convencional	19	5377 ^b $\pm$ 1428	3726 - 8268
	Hidropônico	18	8243 ^c $\pm$ 982	6461 - 9703

n: número de amostras; s: estimativa do desvio padrão; ^{a, b, c} Valores seguidos por diferentes letras indicam diferença ($P<0,05$) entre os tipos de cultivo para cada vegetal.

Cabe destacar que estudos comparativos têm demonstrado uma menor concentração de nitrato em vegetais cultivados pela agricultura orgânica em relação a convencional (STOPES et al., 1989; GENTO, 1994; WOESE, et al.,

1997; YORDANOV et al., 2001; BOURN & PRESCOTT, 2002). Porém, alguns estudos não indicaram essa diferença (PÉRES-LLAMAS et al., 1996; MALMAURET, et al., 2002) e, em outros, foi relatado o oposto (GENT, 2002; MARTIN & RESTANI, 2003).

A presença de nitrato em vegetais é devido ao nitrato adicionado ou formado no meio nutriente, sendo que o suprimento de nitrogênio é o mais importante fator nutricional que afeta o acúmulo de nitrato em vegetais. O efeito usual é que aumentando o nível da nutrição nitrogenada, aumenta-se a concentração de nitrato nos vegetais (MAYNARD et al., 1976).

Fertilizantes minerais compostos por nitrato, fosfato e potássio estão na forma disponível para as plantas. Fertilizantes orgânicos contêm os nutrientes na forma de sais nitrogenados e compostos orgânicos, os quais são gradualmente desprendidos e tornam-se disponíveis para as plantas, como resultado da ação de microrganismos presentes no solo (SAFFRON, 1997). Isto explica o que foi observado com as amostras de alface e rúcula cultivadas por hidroponia, na qual o nitrato está totalmente disponível, o que permite a sua completa absorção da solução nutritiva e, conseqüentemente, maior teor de nitrato nessas plantas em relação às demais. Já nas amostras de agrião, não foi verificada diferença entre os sistemas de cultivo orgânico e hidropônico, sendo que o teor de nitrato nas amostras destes cultivos foi superior ao das cultivadas tradicionalmente. Esses resultados podem ser devidos à diferença no grau de absorção e assimilação de nitrato de diferentes variedades de agrião e/ou quantidade de fertilizante utilizado (MAYNARD et al., 1976), os quais não foram considerados neste estudo.

Foi possível verificar uma variação no teor de nitrato nas amostras de alface cultivadas no período de outono a inverno, entre os diferentes produtores de cada sistema de cultivo (**Figura 2**). A concentração de nitrato em todas as espécies analisadas variou em relação as diferentes partes da planta (**Tabela 5**). Em geral houve um maior acúmulo de nitrato no talo em relação ao restante da folha. A diferente capacidade de acumular nitrato pode estar relacionada com uma

diferente localização da atividade da enzima nitrato redutase, bem como aos diferentes graus de absorção e transporte na planta (MAYNARD et al., 1976).

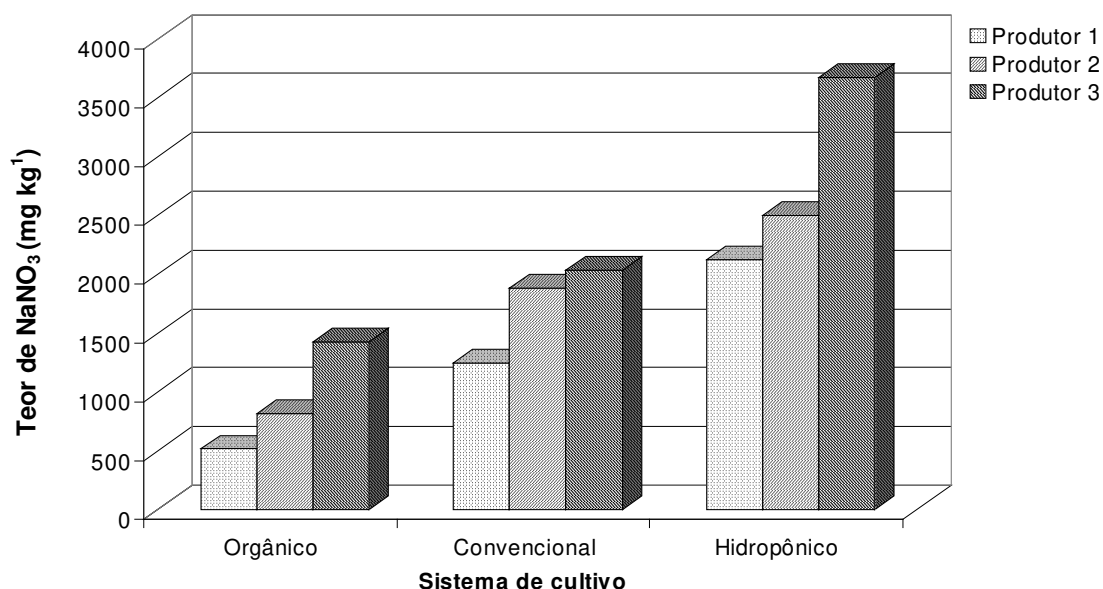


Figura 2. Teor médio de nitrato em alface procedente da agricultura orgânica, convencional e hidropônica, cultivada por diferentes produtores no período de outono a inverno.

Tabela 5. Teor de nitrato em diferentes partes da planta.

Vegetal	Cultivo	Teor $\text{NaNO}_3 \pm s$ (mg kg^{-1})		Relação T/F
		Talo (T)	Folha (F)	
Agrião	hidropônico	7126 ± 191	3750 ± 140	1,90
	orgânico	8187 ± 159	3158 ± 71	2,59
Alface	convencional	1470 ± 118	577 ± 74	2,55
	Hidropônico	3927 ± 198	3084 ± 93	1,27
Rúcula	orgânico	5057 ± 116	1002 ± 53	5,05
	Convencional	7160 ± 147	2865 ± 84	2,50

s: estimativa do desvio padrão (n=3).

3.3. Teor de nitrato em hortaliças folhosas em relação ao período sazonal

O teor de nitrato nas plantas varia com a época sazonal de cultivo, uma vez que a duração do dia e intensidade luminosa influencia na atividade da enzima nitrato redutase. Em fotoperíodos curtos (inverno) onde as plantas são submetidas à baixa intensidade luminosa, o acúmulo tende a ser maior (MAYNARD et al., 1976; VAN DER BOON et al., 1990).

Com relação ao teor médio de nitrato encontrado nas amostras de agrião orgânico e hidropônico, não houve diferença ($P<0,05$) entre os períodos sazonais estudados (**Figura 3**).

O teor médio de nitrato em alface orgânica foi superior ($P<0,05$) nas plantas cultivadas no inverno em relação às cultivadas no outono. As amostras de alface convencionais cultivadas no outono apresentaram um teor médio de nitrato superior ($P<0,05$) ao das plantas cultivadas na primavera e no verão, entre estes, no entanto, não foi verificada diferença significativa. As plantas cultivadas no inverno somente diferiram ($P<0,05$) das cultivadas na primavera. O teor de nitrato em alface hidropônica não sofreu influência do período sazonal, não havendo diferença ($P<0,05$) entre os períodos estudados (**Figura 4**).

No cultivo de rúcula orgânica no outono verificou-se um aumento ($P<0,05$) no teor de nitrato em relação ao cultivo na primavera e no verão. As plantas cultivadas no inverno apresentaram um teor médio de nitrato superior ($P<0,05$) ao das cultivadas no verão. As amostras de rúcula convencional apresentaram um teor médio de nitrato superior ($P<0,05$) quando cultivadas no outono, em relação às cultivadas no inverno, primavera e verão, sendo que nestes últimos não houve diferença ($P<0,05$). No cultivo hidropônico não foi verificada diferença ($P<0,05$) entre os períodos sazonais estudados (**Figura 5**).

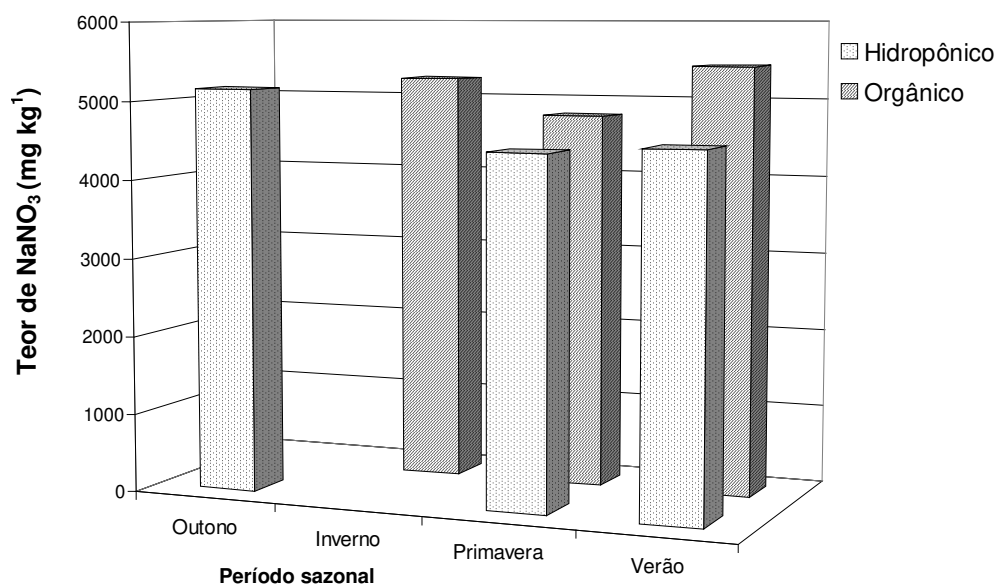


Figura 3. Influência do tipo de cultivo e período sazonal no teor médio de nitrato em abacate.

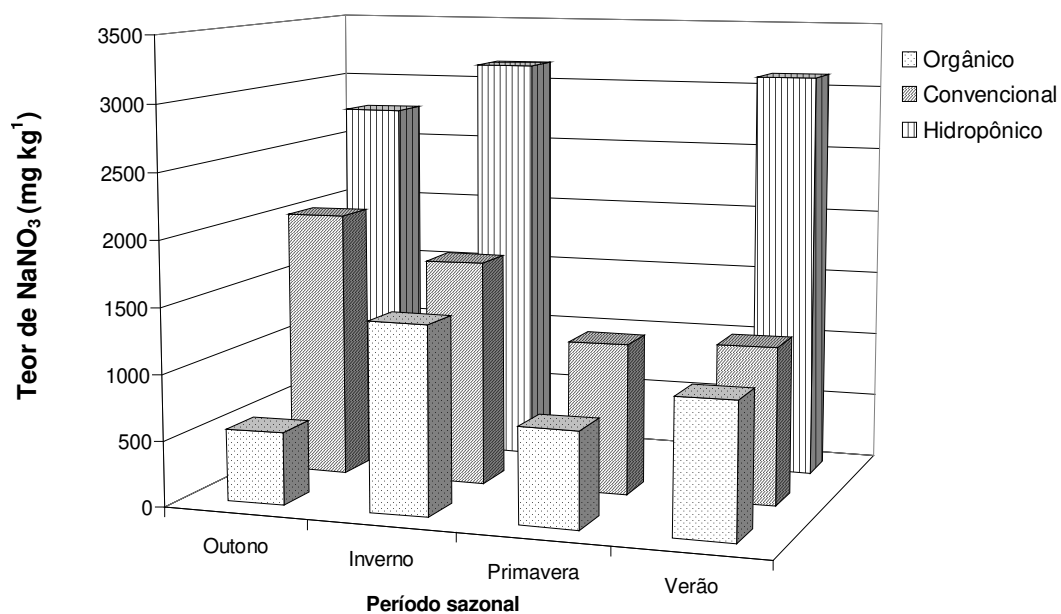


Figura 4. Influência do tipo de cultivo e período sazonal no teor de nitrato em alface.

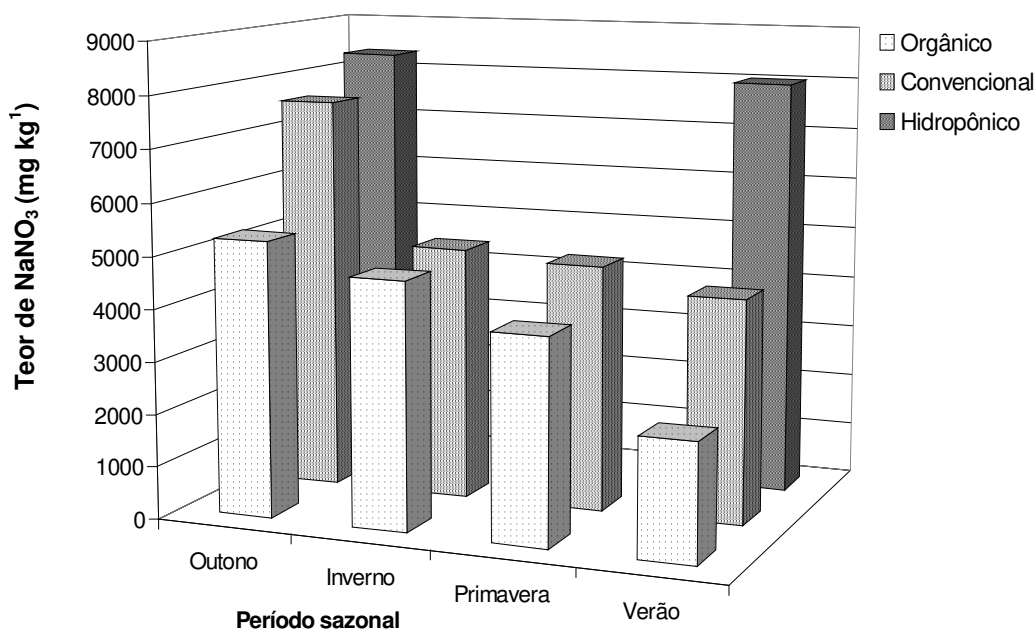


Figura 5. Influência do tipo de cultivo e período sazonal no teor médio de nitrato em rúcula.

Neste estudo, não foi verificada diferença ($P < 0,05$) entre o teor de nitrato nas amostras hidropônicas cultivadas em diferentes períodos sazonais. Alguns estudos realizados na Europa têm demonstrado que os níveis de nitrato em vegetais cultivados no inverno são superiores aos dos cultivados no verão (MAFF, 1998; 1999; PETERSEN & STOLTZE, 1999; YSART et al., 1999), fato somente observado nas amostras de agrião e rúcula, orgânicas e convencionais e em alface convencional. Esta disparidade nos resultados pode ser devido a diferentes condições ambientais, visto que em hidropônia o cultivo é realizado em casa de vegetação.

3.4. Estimativa da ingestão diária de nitrato

A estimativa da ingestão diária da população brasileira ao nitrato foi baseada no consumo médio anual per capita de agrião e alface, fornecido pelo IBGE (2003), sendo que o consumo de rúcula, dado não disponível por este órgão, foi estimado como semelhante ao do agrião.

De acordo com os dados disponíveis, o consumo diário de agrião e rúcula variam de 0,07 a 1,3 g e o de alface de 0,3 a 3,1 g, em relação as principais capitais do Brasil. A **Tabela 6** mostra a estimativa da ingestão de nitrato calculada a partir do valor máximo de consumo de agrião, alface e rúcula, para cada tipo de cultivo.

Dentre os vegetais incluídos neste estudo, os cultivados por hidroponia são os responsáveis pela maior contribuição na ingestão de nitrato, ou seja, cerca de 8,6% da IDA estabelecida para este íon.

Tabela 6. Estimativa da ingestão diária máxima de íon nitrato a partir do consumo de agrião, alface e rúcula.

Vegetal	Consumo diário (g)	Estimativa da ingestão de nitrato (mg)		
		Orgânico	Convencional	Hidropônico
Agrião	1,30	5,00	1,20	4,60
Alface	3,10	1,90	3,00	6,70
Rúcula	1,30	3,90	5,10	7,80
Total	5,70	10,80	9,30	19,1
Porcentagem da IDA*	-	4,86	4,20	8,60

* IDA ($3,7 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corpóreo, expresso como íon nitrato, por dia) foi multiplicada pelo peso médio de um adulto de 60 kg = 222 mg.

4. CONCLUSÕES

O método de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica utilizado para determinação de nitrato através do complexo ternário FeSCNNO^+ é adequado para o monitoramento de nitrato em hortaliças folhosas, além de apresentar as seguintes vantagens: emprego de reagentes não carcinogênicos, baixo consumo de reagentes e elevada frequência analítica.

O teor de nitrato nas espécies analisadas variou de 115 a 9703 mg kg^{-1} , sendo que agrião e rúcula foram as que apresentaram um maior acúmulo.

Os resultados indicam que, em geral, hortaliças folhosas cultivadas por hidroponia apresentam teor de nitrato superior àqueles produzidos por cultivo convencional, e este superior ao orgânico. Dos vegetais analisados, somente as amostras de agrião não apresentaram diferença no teor médio de nitrato entre os cultivos orgânico e hidropônico, sendo que nas amostras cultivadas convencionalmente o teor médio de nitrato foi inferior aos demais.

O teor de nitrato para cada espécie vegetal analisado variou entre os diferentes produtores. Também houve variação entre diferentes partes da planta, sendo que o acúmulo de nitrato foi superior no talo em relação ao restante da folha e com relação ao período sazonal.

Neste estudo foi verificada diferença entre o teor de nitrato nas amostras cultivadas em diferentes períodos sazonais, exceto nas amostras de cada espécie cultivadas por hidroponia. Nas amostras de agrião e rúcula, orgânicas e convencionais e de alface convencional houve um maior acúmulo de nitrato no período entre outono e inverno.

A ingestão diária máxima de nitrato calculada a partir do consumo das hortaliças estudadas, representa cerca de 8,6% do valor de ingestão diária aceitável (IDA) estabelecida para este íon (3,7 mg de íon nitrato kg^{-1} de peso corporal por dia).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMR, A.; HADIDI, N. Effect of Cultivar and Harvest Date on Nitrate (NO_3) and Nitrite (NO_2) Content of Selected Vegetables Grown Under Open Field and Greenhouse Conditions in Jordan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 59-67, 2001.
- ANDRADE, R.; VIANA, C.O.; GUADAGNIN, 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, 16. ed., Gaithersburg, 1997.
- COCHRAN, W. G. *Sampling techniques*, 3. ed. J. Wiley, New York, 1977. 428 p.
- BLISKA; A.; HONÓRIO, S.L. *Hidroponia*. Cartilha tecnológica, UNICAMP, 1995.
- BOURN, D.; PRESCOTT, J. A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 1-34, 2002.
- 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.
- GENT, M.P.N. Growth and composition of salad greens as affected by organic compared to nitrate fertilizer and by environment in high tunnels. *Journal of Plant Nutrition*, 25, 981-998, 2002.
- GENTO, P.D. Contenido de nitratos en vegetales cultivados de la provincia de Valencia. *Alimentaria*, 249, 49-51, 1994.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2003. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 03 dez. 2003.

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

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

LYONS, D.J.; RAYMENT, G.E.; NOBBS, P.E.; McCALLUM, L. Nitrate and nitrite in fresh vegetables from Queensland. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 64, 274-281, 1994.

MAFF Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. *Food Surveillance Information Sheet 158: Nitrate in vegetables*. United Kingdom, 1998. Disponível em <<http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1998/no158/158nitra.htm>>. Acesso em: 23 abr. 2002.

MAFF Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. *Food Surveillance Information Sheet 177: Nitrate in lettuce and spinach*. United Kingdom, 1999. Disponível em <<http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1999/no177/177nitra.htm>>. Acesso em: 23 abr. 2002.

MALMAURET, L.; PARENT-MASSIN, D.; HARDY, J.L.; VERGER, P. Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Additives and Contaminants*, 19, 524-532, 2002.

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

MAYNARD, D.N.; BARKER, A.V.; MINOTTI, P.L.; PECK, N.H. Nitrate accumulation in vegetables. *Advances in Agronomy*, 28, 71-118, 1976.

McCALL, D.; WILLUMSEN, J. Effects of Nitrate, Ammonium and Chloride Application on the Yield and Nitrate Content of Soil-Grown Lettuce. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 73, 698-703, 1998.

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

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 Chemical Toxicology*, 37, 297-305, 1999.

MIYAZAWA, M.; KHATOUNIAN, A. A.; PENHA, L. A. O. Teor de nitrato nas folhas de alface produzida em cultivo convencional, orgânico e hidropônico. *Agroecologia*, fevereiro/março, 23, 2001.

PENTEADO, S.R. *Introdução à agricultura orgânica: normas e técnicas de cultivo*. Campinas: Grafimagem, 2000, 110p.

PÉRES-LLAMAS, F.; NAVARRO, I.; MARÍN, J.F.; MADRID, J.A.; ZAMORA, S. Estudio comparativo sobre la calida nutritiva de alimentos procedentes de la agricultura ecologica y convencional. *Alimentaria*, 274, 39-44, 1996.

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

RESH, H.M. *Hydroponic food production: a definitive guide book for the advanced home gardener and the commercial hidroponic grower*. 5. ed. Woodbridge Press Publishing Company, Santa Barbara, CA, 1995. 527p.

SAFFRON, L. Agriculture, food and cancer risk. Disponível em: <<http://www.uwe.ac.uk/fas/uae/cancer1.pdf>>. Acesso em 10 jun. 2003.

SIDDIQI, M.; KUMAR, R.; FAZILI, Z.; SPIEGELHALDER, B.; PREUSSMANN, R. Increased exposure to dietary amines and nitrate in a population at high risk of oesophageal and gastric cancer in Kashmir (India). *Carcinogenesis*, 13, 1331-1335, 1992.

STEINGROVER, E.G.; STEENHUIZEN, J.W.; VANDERBOON, J. Effects of low-light intensities at night on nitrate accumulation in lettuce grown on a recirculating

nutrient solution. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 41, 13-21, 1993.

STOPES, C.; WOODWARD, L.; FORDE, G.; VOGTMANN, H. Effects of composted FYM and a compound fertiliser on yield and nitrate accumulation in three summer lettuce cultivars grown in an organic system. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 27, 555-559, 1989.

TEIXEIRA, N.T. *Hidroponia: uma alternativa para pequenas áreas*. Guaíba, Agropecuaria, 1996. 86p.

VAN DER BOON, J.; STEENHUIZEN, J.W.; STEINGRÖVER, E.G. Growth and nitrate concentration of lettuce as affected by total nitrogen and chloride concentration, NH_4/NO_3 ratio and temperature of the recirculating nutrient solution. *Journal of Horticultural Science*, 65, 309-321, 1990.

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. Naturally occurring nitrate/nitrite in foods. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 26, 1735-1742, 1975.

WALKER, R. Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: 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 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 Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, Geneva, 2003.

WOESE, K.; LANGE, D.; BOESS, C.; BÖGL, K. W. A comparison of organically and conventionally grown foods – results of a review of the relevant literature.

Journal of Science of Food and Agriculture, 74, 281-293, 1997.

YORDANOV, N.D.; NOVAKOVA, E.; LUBENOVA, S. Consecutive estimation of nitrate and nitrite ions in vegetables and fruits by electron paramagnetic resonance spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 437, 131-138, 2001.

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

CAPITULO 3

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO NA SOLUÇÃO NUTRITIVA E DO PERÍODO SAZONAL NO ACÚMULO DE NITRATO EM ALFACE HIDROPÔNICA

Este trabalho será submetido para publicação na Revista Alimentaria.

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO NA SOLUÇÃO NUTRITIVA E DO PERÍODO SAZONAL NO ACÚMULO DE NITRATO EM ALFACE HIDROPÔNICA

RESUMO

Vegetais folhosos, dentre eles a alface, tendem a acumular nitrato, o que depende de fatores genéticos, da sua disponibilidade para a planta e de fatores ambientais, como intensidade luminosa, temperatura e umidade, entre outros. O presente trabalho avaliou o efeito da concentração de nitrato na solução nutritiva e do período sazonal no acúmulo de nitrato em alface cultivada por hidroponia. As plantas foram submetidas a três tratamentos: solução nutritiva recomendada pelo fabricante, contendo 152 mg L^{-1} de nitrato (SN), SN menos 25% m/v de nitrato (SN-25) e SN mais 25% m/v de nitrato (SN+25). Os ensaios foram realizados em fevereiro/março (verão) e julho/agosto (inverno) de 2002. No verão foi verificada diferença ($P < 0,05$) entre os três tratamentos, sendo que o teor médio de nitrato nas alfaces cultivadas com a solução SN+25 foi superior ao das cultivadas com a SN e este superior ao da SN-25. Este comportamento não foi verificado no inverno, onde o teor médio de nitrato não diferiu ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Verificou-se, ainda diferença ($P < 0,05$) entre o teor de nitrato nas alfaces cultivadas no verão e inverno, exceto as cultivadas na solução SN. As plantas cultivadas na solução SN-25 apresentaram um maior acúmulo de nitrato no inverno, ao passo que nas cultivadas na solução SN+25 no inverno, o teor desse íon foi inferior comparado ao verão. No verão, a diminuição da concentração de nitrato na solução nutritiva (SN-25) prejudicou o crescimento, a coloração e a uniformidade foliar das plantas. Enquanto que no inverno, o excesso de nitrato na solução nutritiva (SN+25) inibiu o acúmulo desse íon na planta, assim como prejudicou o crescimento da mesma. Esses resultados indicam a importância do controle do teor de nitrato na solução nutritiva no cultivo por hidroponia.

Palavras-chaves: alface, nitrato, hidroponia, período sazonal.

EFFECT OF THE NITRATE CONCENTRATION IN THE NUTRIENT SOLUTION AND OF SEASON ON ACCUMULATION OF NITRATE IN HYDROPONIC LETTUCE

SUMMARY

Leafy vegetables have a tendency to accumulate nitrate, the amount depending on genetic factors, the availability for this nutrient for the plant environmental factors. The present work evaluated the effect of the nitrate concentration in the nutrient solution and of the season on the accumulation of nitrate in lettuce cultivated by hydroponics. The plants were submitted to three treatments: nutrient solution recommended by the manufacturer, containing 152 mg L^{-1} of nitrate (NS), NS minus 25% m/v of nitrate (NS-25) and NS plus 25% m/v of nitrate (NS+25). The assays were carried out in February/March (summer) and July/August (winter) of 2002. In the summer, a difference ($P < 0.05$) between the three treatments was verified, the average nitrate content in the lettuces cultivated in the NS+25 being higher than that of those cultivated in the NS which was higher than those cultivated in NS-25. This behavior was not shown in the winter season, where the average nitrate content did not differ ($P < 0.05$) between the treatments. A difference ($P < 0.05$) was found in the nitrate content between the lettuces cultivated in the summer and those cultivated in the winter, except for those cultivated in the NS solution. The plants cultivated in NS-25 solution presented a greater accumulation of nitrate in the winter, whereas those cultivated in the NS+25 solution showed a lower content of this ion in the winter than in the summer. In the summer, a reduction in the nitrate concentration in the nutrient solution (NS-25) was detrimental to growth, color and leaf uniformity of the plants. In the winter, excess nitrate in the nutrient solution (NS+25) inhibited the accumulation of this ion in the plant, as well as harming its growth. These results indicate the importance of controlling the nitrate content of the nutrient solution in the hydroponics.

Keywords: lettuce; nitrate; hydroponics; season.

1. INTRODUÇÃO

Os íons nitrato e nitrito estão presentes naturalmente no ambiente, como consequência do ciclo do nitrogênio que consiste no intercâmbio desses elementos entre a atmosfera e o solo, podendo sofrer modificações profundas, decorrentes das atividades agrícolas e industriais do homem (ARAÚJO & MIDIO, 1989).

O nitrato é, freqüentemente, a principal fonte de nitrogênio disponível para as plantas cultivadas por hidroponia (RESH, 1995). Após a absorção, o nitrato é reduzido a amônio pelas enzimas redutase do nitrato e redutase do nitrito. O amônio é incorporado em aminoácidos, proteínas e outras moléculas orgânicas nitrogenadas (MARSCHNER, 1990). No entanto, o uso de nitrato na produção de vegetais hidropônicos pode resultar na sua acumulação nas plantas, quando a absorção exceder a assimilação (BLOM-ZANDSTRA, 1989).

O teor de nitrato nos tecidos vegetais é determinado por vários fatores, com destaque para: luminosidade, disponibilidade de nitrato e molibdênio, interação de nutrientes, tipos e fontes de adubos nitrogenados. Em adição, a concentração de nitrato depende da temperatura, umidade relativa do ar, do horário de colheita, do sistema de cultivo, estágio de maturação, da parte e da espécie da planta (MAYNARD et al., 1976; VAN DER BOON et al., 1990; STEINGRÖVER et al., 1993; LYONS et al., 1994; McCALL & WILLUMSEN, 1998; AMR & HADIDI, 2001; GENT, 2003).

A intensidade luminosa parece ser, dentre os fatores ambientais, o de maior influência no acúmulo de nitrato em plantas, atuando na atividade da enzima nitrato redutase, aumentando a assimilação de nitrato e diminuindo o teor desse íon nas plantas. O alto acúmulo de nitrato que ocorre quando as plantas são submetidas à baixa intensidade luminosa está bem documentado na literatura (MAYNARD et al., 1976; VAN DER BOON et al., 1990).

O teor de nitrato também varia com a época sazonal de cultivo, uma vez que a duração do dia, ao qual são submetidas às plantas, influencia na

atividade da enzima nitrato redutase. Em fotoperíodos curtos (inverno) o acúmulo tende a ser maior (VAN DER BOON et al., 1990).

Algumas espécies de vegetais, tais como beterraba, aipo, alface, e espinafre podem acumular mais de 2500 mg de nitrato por kg de matéria fresca (BLOM-ZANDSTRA, 1989). Alface cultivada por hidroponia no norte da Europa, no inverno, pode acumular até 5500 mg kg⁻¹ (VAN DER BOON et al., 1990). Steingrover et al. (1993) verificaram que é possível cultivar alface por hidroponia durante o inverno com teor de nitrato de aproximadamente 2900 mg kg⁻¹. Na Austrália, Lyons et al. (1994) verificaram uma concentração média de nitrato em alface hidropônica de 2059 mg kg⁻¹. Um estudo realizado no Chile demonstrou que o teor de nitrato em alface hidropônica varia com o tipo de cultivar, sendo em média de 2500 mg kg⁻¹ (URRESTARAZU et al., 1998). Gent (2003) verificou um maior nível de nitrato, cerca de 3500 mg kg⁻¹, em alface hidropônica cultivada no inverno com uma alta concentração desse íon na solução nutritiva.

Têm sido relatados diferentes métodos de reduzir o teor de nitrato em alface e outros vegetais folhosos cultivados por hidroponia, sem prejudicar o crescimento da cultura. Alguns estudos usam a correlação negativa entre nitrato e radiação (STEINGRÖVER et al., 1993) ou temperatura (VAN DER BOON et al., 1990). Outros empregam a eliminação do N-nítrico (N-NO₃) e/ou substituição parcial por Cl⁻ ou N-amoniaco (N-NH₄) poucos dias antes da colheita (VAN DER BOON et al., 1990; STEINGRÖVER et al., 1993; SANTAMARIA et al., 1998; URRESTARAZU et al., 1998).

A importância do nitrato para saúde humana está relacionada ao fato que nitrato é facilmente convertido a nitrito, o qual pode reagir com aminas secundárias e terciárias formando compostos N-nitrosos, os quais são potentes carcinógenos. Nitrito também interage com hemoglobina afetando o transporte de oxigênio levando a metaemoglobinemia (WALKER, 1990).

A preocupação com os altos teores de nitrato em vegetais fez com que vários países europeus estabelecessem como limite máximo permitido para alface produzida em casa de vegetação, teores de nitrato na massa de matéria

fresca de 3500 mg kg⁻¹ para o período de verão, 4500 mg kg⁻¹ para o período de inverno. O limite máximo para alface produzida em campo aberto é de 2500 mg kg⁻¹ (MAFF, 1999). Cabe ressaltar que o Brasil não dispõe de legislação para limites do teor de nitrato em vegetais.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da concentração de nitrato na solução nutritiva e do período sazonal no acúmulo de nitrato em alface cultivada por hidroponia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições de cultivo

2.1.1. Localização

O cultivo de alface por hidroponia foi realizado em casa de vegetação na área experimental da Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. A área experimental se situa a 684,54 m de altitude, determinada por GPS (Ranging Global Positioning System), equivalente a uma pressão atmosférica de 93.333,3 Pa, determinada pelo software Plus (ALBRIGHT, 1990). Com coordenadas geográficas de 22°49'06" de latitude Sul e 47°03'41" de longitude Oeste. O clima, segundo a classificação de Köpen, é do tipo Cwa, subtropical seco no inverno, com temperatura média anual de 24,5 °C e precipitação média anual de 1.360 mm.

2.1.2. Casa de vegetação e sistema hidropônico

A casa de vegetação utilizada foi com telhado do tipo "Howe" em duas águas, com estrutura em aço, cortinas laterais de polietileno com acionamento manual, frontalmente fechada com filme de polietileno fixo e coberta com filme de polietileno (PEBD) de 0,20 mm de espessura, aditivado contra raios ultravioleta (UV), possuindo as seguintes dimensões: 6,50 m de largura, 11,00 m

de comprimento, 3,00 m de altura do pé direito e 5,00 m de altura da cumeeira, com um volume de 231 m³.

Dentro da casa de vegetação foi montada uma bancada para hidroponia com 3 m de comprimento com 9 canais de polipropileno, comportando 15 plantas por canal. A bancada foi orientada no sentido norte-sul, proporcionando a todas as plantas a mesma exposição à radiação solar.

O sistema de fornecimento de solução nutritiva foi composto por: três reservatórios de cimento amianto, com capacidade para 200 litros; uma bomba de 1/3 CV (220 V, 1500 rpm). A distribuição da solução nutritiva em cada canal foi feita por tubos do tipo espaguete ligados a uma mangueira de polietileno de 19 mm instalada na extremidade mais alta da bancada, ligada na tubulação de 60 mm. O retorno da solução para o reservatório foi realizado através de tubulação de 100 mm instalada na extremidade mais baixa da bancada.

A irrigação ocorreu das 5 às 22 hs.

2.1.3. Produção das mudas

As mudas de alface tipo crespa (*Lactuca sativa* L., cultivar Vera), foram produzidas por semeadura em bandejas com substrato espuma fenólica, irrigadas com água por micro aspersão. Após 23 dias, as mudas foram transferidas para os canais.

2.1.4 Tratamentos

As mudas de alface foram submetidas a três tratamentos: (i) solução nutritiva recomendada pelo fabricante (SN); (ii) solução nutritiva recomendada pelo fabricante menos, aproximadamente, 25% m/v de nitrato (SN-25) e (iii) solução nutritiva recomendada pelo fabricante mais, aproximadamente, 25% m/v de nitrato (SN+25), sendo realizados na mesma bancada (três canaletas para cada tratamento) e utilizando reservatórios de 200 L. Nestas condições, foi determinado o teor de nitrato durante a maturação da planta, bem como o desenvolvimento e a aparência da mesma.

Os estudos foram realizados nos meses de fevereiro/março (verão) e julho/agosto (inverno) de 2002.

2.1.5. Soluções nutritivas

As soluções nutritivas utilizadas foram preparadas a partir de uma formulação disponível no mercado comercializada pela Hydro-fertilizantes, composta pelos seguintes fertilizantes: Kristalon Laranja, Tenso Fe (6% de Fe), Tenso Cocktail e nitrato de cálcio. A composição de cada fertilizante está apresentada nas **Tabelas 1, 2 e 3**. A concentração total de íons de cada solução foi determinada diariamente com o auxílio de um condutivímetro e corrigida quando necessário, utilizando uma solução de correção mais concentrada. Aproximadamente, 100 mL da solução de correção corrige $0,1 \text{ mS cm}^{-1}$. A condutividade elétrica mantida para o tratamento foi de: $2,20 \text{ mS cm}^{-1}$, $1,90 \text{ mS cm}^{-1}$ e $2,90 \text{ mS cm}^{-1}$, respectivamente para as soluções SN, SN-25 e SN+25. A queda diária da condutividade elétrica foi de aproximadamente $0,1 \text{ mS cm}^{-1}$. A vazão da solução pela canaleta foi de $1,5 \text{ L min}^{-1}$.

Foram preparados 200 L das soluções nutritivas utilizadas no estudo, nas concentrações apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 1. Composição (% m/m) do Kristalon Laranja.

NO₃-N	NH₄-N	N	P₂O₅	K₂O	MgO	S
4,50	1,50	6,00	12,0	36,0	3,00	8,00

Tabela 2. Composição do Tenso Cocktail.

Tenso Cocktail	% m/m
B	0,52
Ca-EDTA	2,57
Cu-EDTA	0,53
Fe-EDTA	2,10
Fe- DTPA	1,74
Mn-EDTA	2,57
Mo	0,13
Zn-EDTA	0,53

Tabela 3. Composição do nitrato de cálcio.

Nitrato de cálcio	% m/m
N-total	15,5
N-nítrico	14,5
N-amoniacoal	1,0
Cálcio hidrossolúvel	19,0

Tabela 4. Composição das soluções nutritivas utilizadas no estudo.

Solução nutritiva	Kristalon laranja (mg L⁻¹)	Nitrato de cálcio (mg L⁻¹)	Tenso Cocktail (mg L⁻¹)	Tenso Fe (% m/v)
SN-25	800	522,5	50	25
SN	800	800	50	25
SN+25	800	1075	50	25

Para realizar a correção de nutrientes nos três tratamentos, foram preparados 2,5 L de uma solução contendo Kristalon Laranja (200 g L^{-1}), Tenso Cocktail (6 g L^{-1}) e Tenso Fe (6 g L^{-1}). Para a correção de nitrato, foram preparados 5,0 L de solução de nitrato de cálcio nas concentrações de 65, 100 e 135 mg L^{-1} para as soluções SN-25, SN e SN+25, respectivamente.

2.2. Coleta e preparo das amostras

Foram coletados, aleatoriamente, cinco pés de alface aos 38, 48 e 59 dias após a semeadura, nos períodos de verão e inverno. A coleta foi realizada sempre no período da manhã, por volta das 9 horas. Além das amostras de alface, foram tomadas alíquotas da solução nutritiva do tanque. As amostras coletadas foram colocadas em sacos plásticos e transportadas por aproximadamente 5 minutos, até o laboratório, situado a 1 km do local de cultivo.

Cada pé de alface foi pesado e dividido em duas partes iguais. As partes comestíveis foram lavadas em água corrente, secas com papel absorvente e trituradas em liquidificador com água na proporção de 1:1 (m/m) até a obtenção de uma massa homogênea. Foram pesadas aproximadamente 5,00 g da massa homogênea, as amostras processadas foram mantidas em $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises.

2.3. Método de análise

2.3.1. Extração do nitrato da matriz

A extração do nitrato da matriz vegetal foi realizada em meio aquoso a $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Aos 5,00 g da amostra foram adicionados 40 mL de água desionizada a $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e a solução foi mantida por 15 minutos em banho-maria. A amostra foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, seu volume completado com água

desionizada. Em seguida a solução foi filtrada em papel de filtro qualitativo Whatman.

2.3.2. Quantificação do nitrato

O nitrato presente no extrato obtido em 2.3.1 foi determinado por análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção espectrofotométrica, conforme descrito por Andrade et al. (2003).

2.4. Análise estatística

O número de amostras (n) analisadas para cada cultivar foi estabelecido através da seguinte equação:

$$400 [(máx.-mín.)/6]/(máx.+mín./2)]^2 \leq n \leq 400 [(máx.-mín.)/4]/(máx.+mín./2)]^2.$$

Onde, máx: teor de nitrato máximo e mín: teor de nitrato mínimo, determinado nas amostras (Cochran, 1977).

Para estabelecer os valores máx. e mín., foram analisados 5 pés de alface. Assim, o número mínimo calculado de amostras a serem analisadas foi de 03 amostras.

A comparação entre as diferentes soluções nutritivas, quanto ao teor de nitrato em alface hidropônica cultivada no verão e inverno, foi realizada por análise de variância e teste *t*. Os testes estatísticos foram realizados através do programa GraphPad Software Prism (versão 2.01).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados disponíveis na literatura sobre o acúmulo de nitrato em alface e outros vegetais indicam que fatores ambientais, quantidade e forma de fertilização nitrogenada e características genéticas são os fatores que mais influenciam no acúmulo de nitrato (MAYNARD et al., 1976; VAN DER BOON et al., 1990; STEINGRÖVER et al., 1993; LYONS et al., 1994; McCALL & WILLUMSEN, 1998; AMR & HADIDI, 2001; GENT, 2003). Assim, os tratamentos SN-25, SN e SN+25 foram realizados no verão e no inverno a fim de avaliar a influência da concentração de nitrato na solução nutritiva e do período sazonal no teor de nitrato em alface cultivada por hidroponia.

3.1. Efeito da concentração de nitrato na solução nutritiva no acúmulo de nitrato pelas plantas

Os resultados obtidos para o teor médio de nitrato em alface hidropônica cultivada em casa de vegetação, nas diferentes soluções nutritivas e em diferentes estágios de maturação, no período de verão e de inverno, estão apresentados na **Tabela 5**.

A faixa do teor de nitrato nas plantas foi de 1248 a 3505 mg kg⁻¹ na massa de matéria fresca. Sendo que o maior nível foi observado nas plantas com 59 dias de cultivo com a solução SN+25, no período do verão, equivalente ao limite de 3500 mg kg⁻¹ na massa de matéria fresca, recomendado pela Comunidade Européia para alface produzida no verão (MAFF, 1999).

Tabela 5. Teores médios de nitrato em alface cultivada por hidroponia, em diferentes estágios de maturação, nos períodos de verão e de inverno.

Período do ano	Tempo de cultivo (dias)	SN-25	SN	SN+25
		$\text{NaNO}_3 \pm \text{ts}_{x0}^*$ (mg kg ⁻¹)	$\text{NaNO}_3 \pm \text{ts}_{x0}$ (mg kg ⁻¹)	$\text{NaNO}_3 \pm \text{ts}_{x0}$ (mg kg ⁻¹)
Verão	38	1637 ± 36	1620 ± 45	1836 ± 40
	48	1248 ± 289	1327 ± 100	2249 ± 177
	59	1918 ± 279	2741 ± 252	3505 ± 226
Inverno	38	1572 ± 45	1620 ± 45	1677 ± 49
	48	2201 ± 100	2052 ± 86	2238 ± 284
	59	2587 ± 347	3086 ± 282	2733 ± 267

* s_{x0} : estimativa do desvio padrão do valor médio (5 determinações) da concentração de nitrato;
t: distribuição t para o intervalo de confiança de 95% com (n-2) graus de liberdade.

Segundo a análise de variância dos resultados relativos às plantas cultivadas no verão com 59 dias de cultivo, tempo recomendado para a colheita e comercialização das mesmas, foi verificada diferença ($P < 0,05$) entre as diferentes soluções nutritivas, sendo que as plantas cultivadas na solução SN-25 apresentaram teor médio de nitrato inferior ao das cultivadas na solução SN, e este inferior ao das cultivadas na solução SN+25. Estes resultados indicam que o teor de nitrato na planta é dependente da concentração de nitrato na solução nutritiva. No entanto, para as plantas cultivadas no inverno, não foi verificada diferença ($P < 0,05$) entre as soluções SN-25, SN e SN+25, quanto ao teor médio de nitrato nas plantas. Estes resultados são discordantes dos encontrados no período de verão, porém corroboram com os encontrados por Van der Boon et al. (1990), os quais verificaram que a diminuição da concentração de nitrato na solução nutritiva não afetou o acúmulo de nitrato em alface cultivada no inverno, tendo ocorrido, entretanto, um marcante decréscimo na primavera.

Ainda, o acúmulo de nitrato nas plantas aumentou principalmente entre os 48 e 59 dias de cultivo. Este fato pode ser explicado pela atividade da enzima nitrato redutase, a qual é usualmente muito baixa quando as folhas das plantas estão completamente desenvolvidas, e consequentemente os níveis de nitrato aumentam (MARSCHNER, 1990).

3.2. Efeito da concentração de nitrato na solução nutritiva no desenvolvimento das plantas

O desenvolvimento das plantas em relação ao teor de nitrato na solução nutritiva foi avaliado pela medida das massas das mesmas. Os resultados das massas das plantas cultivadas nas soluções SN-25, SN, SN+25, nos períodos de verão e inverno, estão apresentadas na **Figura 1**. Os dados são referentes às plantas com 59 dias de cultivo.

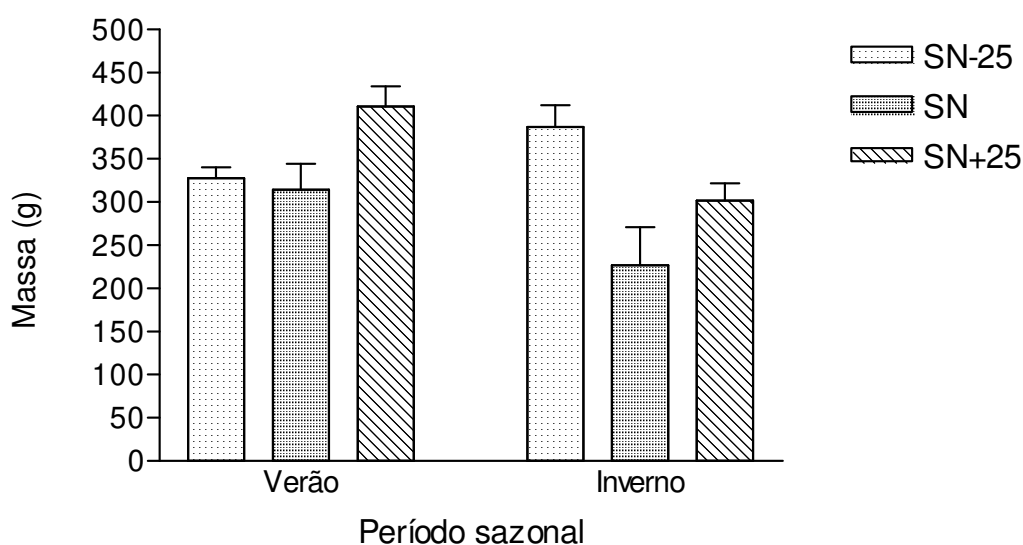


Figura 1. Dados relativos às massas das plantas cultivadas nas diferentes soluções nutritivas, nos períodos de verão e inverno.

As plantas cultivadas com a solução nutritiva SN+25, no verão, apresentaram um desenvolvimento maior do que as demais. Esta situação pode ser explicada pelo fato de que o nitrato quando reduzido a amônia é um nutriente essencial para o crescimento das plantas sendo incorporado como compostos orgânicos nitrogenados (MARSCHNER, 1990). Portanto, com o aumento da concentração de nitrato na solução nutritiva, no período do verão, houve um maior desenvolvimento das plantas.

Ao contrário dos resultados obtidos no período do verão, as plantas cultivadas na solução nutritiva SN-25, no inverno apresentaram um desenvolvimento superior às demais, indicando que no período de inverno é possível utilizar menores níveis de nitrato na solução nutritiva sem afetar negativamente o crescimento da planta.

A avaliação visual das plantas indica que aquelas cultivadas com a solução nutritiva SN-25, no verão, apresentaram coloração verde amarelada e folhas irregulares, diferente das demais, que apresentaram coloração verde e folhas uniformes. Assim, apesar de ser possível diminuir o teor de nitrato na alface, mediante a diminuição da sua concentração na solução nutritiva (SN-25), as plantas cultivadas nesta solução não são adequadas para comercialização, por apresentarem prejuízos quanto à coloração e uniformidade das folhas. Situação semelhante foi observada por Van der Boon et al. (1990), onde a redução da concentração de nitrato na solução nutritiva de 10 para 2,5 mmol L⁻¹, na primavera, foi inaceitável em vista da depressão provocada no crescimento das plantas. Enquanto que no inverno, o excesso de nitrato na solução nutritiva (SN+25) inibiu o acúmulo desse íon na planta, assim como prejudicou o crescimento da mesma. Portanto, a solução SN seria a recomendada para o cultivo de alface, pois o teor médio de nitrato nas plantas cultivadas nesta solução, tanto no verão como no inverno, está abaixo do limite recomendado pela Comunidade Européia.

3.3. Efeito do período sazonal no acúmulo de nitrato pelas plantas

A luminosidade é um fator que varia de acordo com a época do ano e que afeta a absorção de nitrato pelas plantas. Ocorre acúmulo de nitrato quando as plantas são submetidas à baixa intensidade luminosa, ou seja, no inverno (MAYNARD et al., 1976). Para avaliar este fato, comparou-se o teor de nitrato nos períodos de verão e inverno para cada solução nutritiva utilizada no cultivo de alface (**Figura 2**). Todas as amostras para este estudo foram coletadas com 59 dias após semeadura.

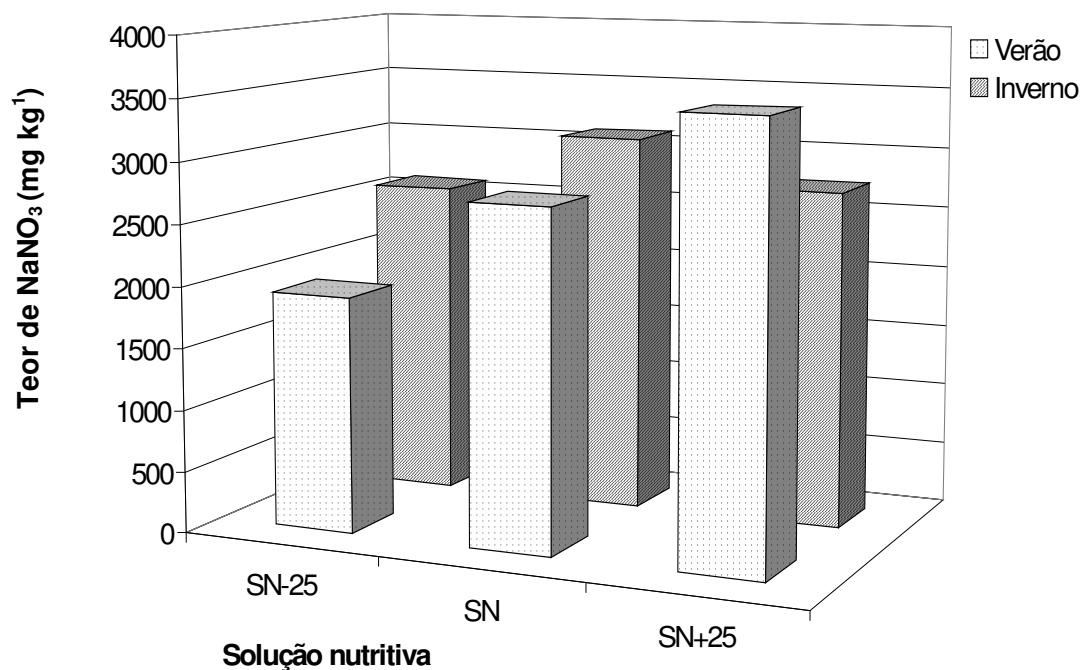


Figura 2. Teor de nitrato nas plantas cultivadas nas diferentes soluções nutritivas, nos períodos de verão e inverno.

Os resultados do teor médio de nitrato nas plantas cultivadas com a solução nutritiva SN-25 indicam diferença ($P<0,05$) entre os períodos sazonais. Houve um maior acúmulo de nitrato nas plantas cultivadas no inverno. Gent (2003) verificou maiores concentrações de nitrato em alface hidropônica quando estas foram cultivadas com baixo suprimento de nitrato e alta condutividade elétrica na solução nutritiva, sob baixa intensidade luminosa no inverno.

Para a solução nutritiva SN, os resultados obtidos indicam que não existe diferença ($P<0,05$) entre o período sazonal, quanto ao teor médio de nitrato nas alfaces.

Os resultados obtidos para o teor médio de nitrato nas alfaces cultivadas na solução nutritiva SN+25 indicam que existe diferença ($P<0,05$) entre as duas estações, sendo que o maior acúmulo de nitrato nas plantas ocorreu no verão. Este resultado não corrobora com os encontrados por estudos realizados em países de clima temperado, onde houve um maior acúmulo de nitrato em plantas cultivadas no inverno. Van der Boon et al. (1990) verificaram que o teor de nitrato em alface hidropônica foi negativamente correlacionado com a intensidade luminosa durante o crescimento. O fato de não ter sido observada essa diferença em nosso estudo pode ser devido às condições ambientais. O verão foi bastante chuvoso, enquanto que o inverno apresentou temperaturas elevadas e a pluviosidade foi muito baixa.

Com relação ao desenvolvimento das plantas, medido pela massa, não houve diferença ($P<0,05$) entre os períodos sazonais para as soluções SN-25 e SN. As plantas cultivadas na solução SN+25 apresentaram um desenvolvimento superior no verão. Gent (2003) observou que com o aumento da irradiação na primavera as plantas cultivadas com alta concentração de nitrato na solução nutritiva cresceram rapidamente.

4. CONCLUSÕES

A concentração de nitrato presente na solução nutritiva afetou o teor de nitrato em alface cultivada por hidroponia. O aumento da concentração de nitrato na solução nutritiva (SN+25) promoveu um maior acúmulo desse íon na planta.

O teor de nitrato nas plantas também variou com o período sazonal de cultivo, sendo que no inverno o acúmulo foi superior ao das cultivadas no verão, na solução SN-25. Nas plantas cultivadas na solução SN não houve diferença no teor de nitrato entre os períodos sazonais. Já nas cultivadas com a solução SN+25 houve um maior acúmulo de nitrato no verão.

O acúmulo de nitrato foi dependente do tempo de maturação das plantas, aumentando paralelamente ao tempo de cultivo das mesmas.

No verão, a diminuição da concentração de nitrato na solução nutritiva (SN-25) prejudicou o crescimento, a coloração e a uniformidade foliar das plantas. Já no inverno, o excesso de nitrato na solução nutritiva (SN+25) inibiu o acúmulo desse íon na planta, assim como prejudicou o crescimento da mesma. Esses resultados indicam a importância do controle do teor de nitrato na solução nutritiva no cultivo por hidroponia.

A concentração de nitrato da solução SN seria a recomendada para o cultivo de alface tanto no verão como no inverno, uma vez a diminuição ou o aumento desse íon na solução nutritiva provocou a perda de qualidade comercial das plantas. Ainda, o teor médio de nitrato nas plantas cultivadas nesta solução nutritiva está abaixo do limite recomendado pela Comunidade Européia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRIGHT, L.D. *Environmental control for animal and plants*. St. Joseph, MI: ASAE, 1990. 455p.

AMR, A.; HADIDI, N. Effect of Cultivar and Harvest Date on Nitrate (NO₃) and Nitrite (NO₂) Content of Selected Vegetables Grown Under Open Field and Greenhouse Conditions in Jordan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 59-67, 2001.

ANDRADE, R.; VIANA, C.O.; GUADAGNIN, 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.

ARAÚJO, A.C.P.; MIDIO, A.F. Nitratos, nitritos e compostos N-nitrosos em alimentos: onde está o problema? *Ciência e Cultura*, 40, 947-956, 1989.

BLOM-ZANDSTRA, M. Nitrate accumulation in vegetables and its relationship to quality. *Annals of Applied Biology*, 115, 553-561, 1989.

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

GENT, M.P.N. Solution eletrical conductivity and ratio of nitrate to other nutirents affect accumulation of nitrate in hydroponic lettuce. *Hortscience*, 38, 222-227, 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2003. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 03 dez. 2003.

LYONS, D.J.; RAYMENT, G.E.; NOBBS, P.E.; McCALLUM, L. Nitrate and nitrite in fresh vegetables from Queensland. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 64, 274-281, 1994.

MAFF Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. *Food Surveillance Information Sheet 177: Nitrate in lettuce and spinach*. United Kingdom, 1999. Disponível em <<http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1999/no177/177nitra.htm>>. Acesso em: 23 abr. 2002.

MARSCHNER, H. *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic Press, 1990. 674 p.

MAYNARD, D.N.; BARKER, A.V.; MINOTTI, P.L.; PECK, N.H. Nitrate accumulation in vegetables. *Advances in Agronomy*, 28, 71-118, 1976.

McCALL, D.; WILLUMSEN, J. Effects of Nitrate, Ammonium and Chloride Application on the Yield and Nitrate Content of Soil-Grown Lettuce. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 73, 698-703, 1998.

RESH, H.M. *Hydroponic food production: a definitive guidebook for the advanced home gardener and the commercial hidroponic grower*. 5. ed. Woodbridge Press Publishing Company, Santa Barbara, CA, 1995. 527p.

SANTAMARIA, P.; ELIA, A.; SERIO, F.; TODARO, E. A survey of nitrate and oxalate in fresh vegetables. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 79, 1882-1888, 1999.

STEINGROVER, E.G.; STEENHUIZEN, J.W.; VAN DER BOON, J. Effects of low-light intensities at night on nitrate accumulation in lettuce grown on a recirculating nutrient solution. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 41, 13-21, 1993.

URRESTARAZU, M.; POSTIGO, A.; SALAS, M.; SÁNCHEZ, A.; CARRASCO, G. Nitrate accumulation reduction using chloride in the nutrient solution on lettuce growing by NFT in semiarid climate conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 21, 1705-1714, 1998.

VAN DER BOON, J.; STEENHUIZEN, J.W.; STEINGRÖVER, E.G. Growth and nitrate concentration of lettuce as affected by total nitrogen and chloride concentration, NH_4/NO_3 ratio and temperature of the recirculating nutrient solution. *Journal of Horticultural Science*, 65, 309-321, 1990.

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

CONCLUSÕES GERAIS

O método de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica utilizado para determinação de nitrato através do complexo ternário FeSCNNO^+ é adequado para o monitoramento de nitrato em vegetais, além de apresentar as seguintes vantagens: emprego de reagentes não carcinogênicos, baixo consumo de reagentes e elevada frequência analítica.

Em geral, vegetais folhosos cultivados por hidroponia apresentam teor de nitrato superior àqueles produzidos por cultivo convencional, e este superior ao orgânico. Dos vegetais analisados somente as amostras de agrião não apresentaram diferença no teor médio de nitrato entre os cultivos orgânico e hidropônico, sendo que nas amostras cultivadas convencionalmente o teor médio de nitrato foi inferior aos demais.

O teor de nitrato para cada espécie vegetal analisado variou entre os diferentes produtores. Também houve variação entre diferentes partes da planta, sendo que o acúmulo de nitrato foi superior no talo em relação ao restante da folha, e com relação ao período sazonal.

Nas amostras de agrião e rúcula, orgânicas e convencionais e de alface convencional houve um maior acúmulo de nitrato no período entre outono e inverno.

A ingestão diária máxima de nitrato calculada a partir do consumo de agrião, alface e rúcula, representa cerca de 8,6% do valor de ingestão diária aceitável (IDA) estabelecida para este íon (3,7 mg de íon nitrato kg^{-1} de peso corporal por dia).

A concentração de nitrato presente na solução nutritiva afetou o teor de nitrato em alface cultivada por hidroponia. No verão, o aumento da concentração de nitrato na solução nutritiva (SN+25) promove maior acúmulo desse íon na planta. Isto não ocorre no inverno.

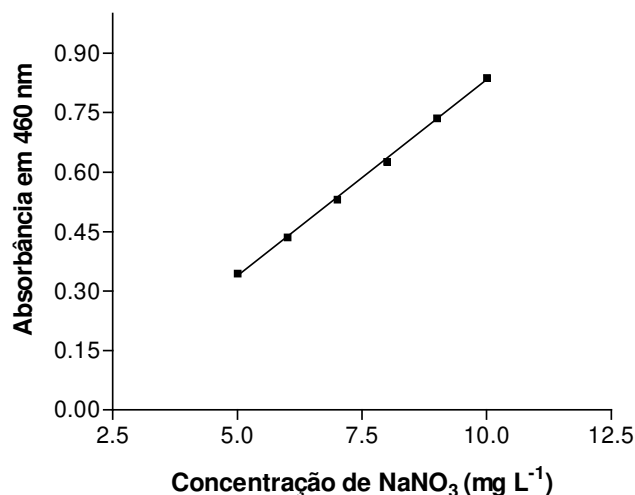
O acúmulo de nitrato nas plantas cultivadas nas diferentes soluções nutritivas variou em relação ao período sazonal, exceto para as cultivadas na

solução SN. No inverno, o acúmulo de nitrato foi superior ao das cultivadas no verão, na solução SN-25, enquanto que nas cultivadas com a solução SN+25 houve um maior acúmulo no verão.

A concentração de nitrato da solução SN seria a recomendada para o cultivo de alface tanto no verão como no inverno, uma vez a diminuição (SN-25) ou o aumento (SN+25) desse íon na solução nutritiva provocou a perda de qualidade comercial das plantas. Ainda, o teor médio de nitrato nas plantas cultivadas nesta solução nutritiva está abaixo do limite recomendado pela Comunidade Européia.

Esses resultados indicam a importância do controle do teor de nitrato na solução nutritiva no cultivo por hidroponia.

ANEXO I



Curva analítica do íon nitrato obtida pelo método FIA-espectrofotométrico.

Parâmetros da curva analítica obtido pelo do programa GraphPad Software Prism (versão 2.01).

	Absorância 460 nm
Variables	
Slope	0.09883 ± 0.0007878
Y-intercept	-0.1558 ± 0.006060
X-intercept	1.576
1/slope	10.12
95% Confidence Intervals	
Slope	0.09722 to 0.1004
Y-intercept	-0.1682 to -0.1434
Goodness of Fit	
r ²	0.9982
Sy.x	0.007369
Is slope significantly non-zero?	
F	15740
DFn, DFd	1.000, 28.00
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	6
Maximum number of Y replicates	5
Total number of values	30
Number of missing values	0
Residuals	
Points above line	15
Points below line	15
Number of runs	8
P value (runs test)	0.0023
Significantly nonlinear?	Significant

ANEXO II

A FLOW-INJECTION SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR NITRATE AND NITRITE DETERMINATION THROUGH NITRIC OXIDE GENERATION

ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA FOOD CHEMISTRY

Analytical, Nutritional and Clinical Methods

A flow-injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide generation

Raquel Andrade^a, Claudia O. Viana^a, Silvana G. Guadagnin^b,
Felix G.R. Reyes^b, Susanne Rath^{a,*}^aDepartment of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, State University of Campinas, PO Box 6154, 13083-970 Campinas, SP, Brazil^bDepartment of Food Science, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas, PO Box 6121, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

Received 10 April 2002; received in revised form 2 October 2002; accepted 2 October 2002

Abstract

A flow injection method with novel spectrophotometric detection for the determination of nitrite and nitrate in foodstuffs is presented. The method is based on the reduction of nitrite and nitrate to nitric oxide, with subsequent reaction with iron (II) and thiocyanate in an acid medium, forming FeSCNNO^+ . The absorbance of the complex, with a maximum at 460 nm, is proportional to the nitrite and nitrate concentrations. The NO is generated in two stages: (1) reduction of nitrate to nitrite in a cadmium copper reductor column and (2) reduction of the nitrite to NO in a sulfuric acid medium. The influence of reagent concentrations and manifold parameters were evaluated. Nitrite and nitrate can be determined in the range of 0.30–3.00 and 1.00–10.00 mg l⁻¹, respectively. The sampling rate of analyses was 30–40 h⁻¹ and, considering a sample of 5.0 g, the determination limit of the method was 20 and 13 mg kg⁻¹ of nitrate and nitrite, respectively. Nitrite and nitrate were determined in vegetables and meat products by the proposed method. The precision and accuracy of the proposed method were comparable to those of the reference spectrophotometric method (official AOAC reference method for the determination of nitrate in foodstuffs).

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Nitrite; Nitrate; Meat products; Vegetables; FI analysis

1. Introduction

Nitrate and nitrite are commonly monitored for environmental protection purposes, in water, agriculture and food control. Nitrate is naturally present in vegetables and its concentration varies enormously, ranging from 1 to 10,000 mg kg⁻¹ fresh weight. Furthermore, nitrate, as well as nitrite, have been added intentionally during the curing process of certain meat products, due to their ability to inhibit the growth of spores of *Clostridium botulinum* and to impart characteristic color and flavor to this kind of foodstuffs (Binkered & Kolari, 1975).

The toxicity of nitrite is primarily due to its interaction with blood pigment to produce methemoglobinemia. It has been also reported that nitrate can be reduced *in vivo* to nitrite which can react with secondary or tertiary amines to form N-nitroso compounds, some

of which are known to be carcinogenic, teratogenic and mutagenic (MAFF, 1992).

Several methods have been reported for the quantitative determination of nitrate and nitrite, including kinetic methods (Koupparis, Walczak, & Malmstadt, 1982; Liang, Iwatsuki, & Fukasawa, 1994), chromatography (Butt, Riaz, & Iqbal, 2001; Siu & Henshall, 1998), potentiometry (Li, Wu, Yuan, Lin, & Yu, 1994; Schaller, Bakker, Spichiger, & Pretsch, 1994), amperometry (Bertotti & Pletcher, 1997), polarography (Ximenes, Rath, & Reyes, 2000), capillary electrophoresis (Öztekin, Nutku, & Erim, 2002) and spectrophotometry (AOAC, 1997; Kawakami & Igrashi, 1996). Among them, the spectrophotometric method, based on the reduction of nitrate to nitrite and subsequent colorimetric determination of nitrite with a diazo-coupling reaction (Griess reaction) has been adopted as an AOAC official method of analysis (1997). However, these methods have the disadvantage of the employment of large volumes of toxic reagents and time-consuming procedures.

* Corresponding author. Fax: +55-19-3788-3023.

E-mail address: raths@iqm.unicamp.br (S. Rath).

This paper describes the development and application of a flow injection spectrophotometric method for the determination of nitrate and nitrite in foodstuffs (vegetables and meat products) based on the formation of FeSCNNO^+ in the flow injection system, whose transient absorbance signal, at 460 nm, is proportional to the nitrate, for example, nitrite concentrations in solution. The method was compared with the recommended AOAC method (AOAC, 1997) adapted to a flow injection system (Giné, Bergamin, Zagatto, & Reis, 1980).

2. Materials and methods

2.1. Apparatus

A diagram of the FI manifold employed is shown in Fig. 1. A four-channel Ismatec peristaltic pump fitted with Tygon tubing (1.2 mm i.d.) was used for the propulsion of fluids. Sample injection was performed by a laboratory-constructed three section manual commutator made in acrylic, with two fixed side-bars and a sliding central bar, that moves for sampling and injection. The absorbance was measured at 460 nm with a FEMTO spectrophotometer (model 432) equipped with a glass flow cell with a 10 mm optical pathway. The transient absorbance signals were monitored by an Intralab two-channel strip-chart-recorder.

2.2. Reagents

All chemicals used were of analytical-reagent grade. Distilled water was used throughout.

2.3. Samples

Meat products (pork sausages and hot-dogs) and fresh vegetables (lettuce, watercress and arugula) were purchased from local markets (Campinas, SP, Brazil).

2.4. Method

2.4.1. Standards

A 100 mg l^{-1} standard solution of nitrite was prepared by dissolving 0.1500 g of sodium nitrite (Merck) in 1000 ml water. A 100 mg l^{-1} standard solution of nitrate was prepared by dissolving 0.1371 g of sodium nitrate (Merck) in 1000 mL water. Working standard solutions of nitrate and nitrite were prepared daily by dilution of the standard stock solutions.

2.5. Cadmium copper reductor column

The spongy cadmium was prepared as described elsewhere (Lara, Takahashi, & Silveira, 1978) and introduced into glass tube (7.5 cm $\times$ 3 mm i.d.), whose ends were closed with glass wool plugs. The cadmium column was coated batchwise with copper by passing a solution containing 0.1% (m/v) copper sulphate in 0.1 mol l^{-1} EDTA (Van Staden, 1982). The column was activated by percolating 100 ml of R1-solution and 50 ml of $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ nitrate. The column was regenerated, when the reduction efficiency changed more than 5%, by percolating, for 5 min, at 1.2 ml min^{-1} the following solutions: (a) 0.1 mol l^{-1} HCl solution, (b) water and (c) R1-solution.

2.5.1. Reagents for the colorimetric reaction FI-system

The reagent solution (R1), pH = 8.5, was obtained by dissolving 100 g ammonium chloride, 20 g sodium tetraborate and 1 g Na_2EDTA in 1000 ml water. A $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ferrous solution (R2) was obtained by dissolving ammonium ferrous sulfate in 0.06 mol l^{-1} sulfuric acid. The 0.4 mol l^{-1} thiocyanate solution (R3) was obtained by dissolving the salt in water.

2.5.2. Sample preparation

For meat products (pork sausages and hot-dogs), the sample (5.00 g) was triturated in a Waring blender. The

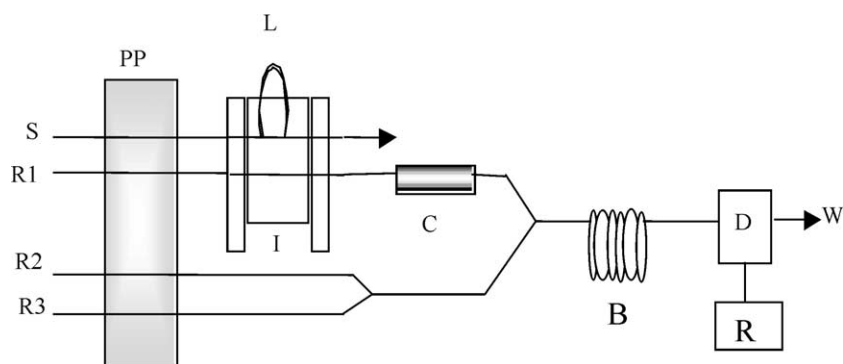


Fig. 1. Schematic diagram of the FI manifold for simultaneous determination of nitrate and nitrite: S: sample; R1: reagent solution; R2: ferrous solution; R3: potassium thiocyanate; PP: peristaltic pump; L: sample loop; I: proportional injector; C: copperized-cadmium reductor column; B: reaction coil; D: detector; R: recorder and W: waste.

nitrate and nitrite were extracted from the samples with hot water (70 °C, 15 min) and clarification of the extract was conducted by addition of the Carrez reagent (0.1 mol l⁻¹ potassium hexacyanoferrate (II) aqueous solution and 0.25 mol l⁻¹ zinc acetate aqueous solution) followed by filtration through filter paper (Usher & Telling, 1975). The filtrate was further diluted to obtain the desired concentrations of nitrate and nitrite.

For the vegetables (watercress, arugula and lettuce) the edible part was washed with water and the retained water was removed using filter paper. The samples were homogenized with water 1:1 (m/m) in a Waring blender and 5.0-g portions were stored at -18 °C until analysis. The nitrate and nitrite were extracted from the sample with hot water, as described for the meat products. No clarification procedures were employed for these samples. The extracts were filtered through filter paper and the filtrate was diluted with water before injection in the FI system.

2.5.3. Calibration and quantification procedures

For the calibration graph, standard working solutions in the concentration range of 0.30–3.00 mg l⁻¹ and 1.00–10.00 mg l⁻¹ for nitrite and nitrate, respectively, were employed. The standard or the sample contained in the sample loop (L) was transported by the carrier R1. Only for the nitrate determination did the carrier pass through the reductor column (C). At the confluence point the pre-mixed reagents R2 and R3, were added to the sample zone (Fig. 1). The colorimetric reaction proceeds in the reaction coil and, finally, the chromophore was measured at 460 nm by the spectrophotometer.

3. Results and discussion

In a very strong acidic medium, nitrite is reduced to nitric oxide which, in the presence of thiocyanate and some divalent transition metals (M) forms, in aqueous solution, a ternary complex—MSCNNO⁺. Cobalt (II) and ferrous ions have been employed for quantitative nitrite determination by polarography (Ximenes et al., 2000). In preliminary studies, it has been shown that the absorbance of FeSCNNO⁺, which exhibits a maximum at 460 nm, is proportional to the nitrite concentration. For the development of the spectrophotometric flow injection method, based on the reaction of nitric oxide with ferrous and thiocyanate ions, several parameters were evaluated and optimized by the univariate method in order to achieve optimal conditions for the reduction of nitrate to nitrite and nitrite to nitric oxide and for the chemical reaction of complex formation.

3.1. Optimization of the FI-system

In order to optimize the FI-system (Fig. 1), the reagent concentrations of Fe(II), SCN⁻, and H₂SO₄, as

well as the cadmium copperized reductor column and the length of the reaction coil were evaluated.

Initially the concentration of iron (II) was varied from 1 10⁻⁴ mol l⁻¹ to 12 10⁻⁴ mol l⁻¹ and the sulfuric acid concentration was maintained 100 times more concentrated than the ferrous ion in solution. It was verified that the maximum FeSCNNO⁺ formation was achieved with Fe²⁺ and H₂SO₄ at concentrations of 6 10⁻⁴ and 0.06 mol l⁻¹, respectively (Fig. 2). In order to evaluate the influence of sulfuric acid on the reduction of nitrite to nitric oxide, the ferrous solution (6 10⁻⁴ mol l⁻¹) was prepared in different concentrations of sulfuric acid in the range of 0.03–0.12 mol l⁻¹. At concentration lower than 0.06 mol l⁻¹ the formation of NO was not quantitative. At concentrations from 0.06 to 0.12 mol l⁻¹ no changes in the absorbance at 460 nm were observed.

The influence of thiocyanate ions on the complex formation is shown in Fig. 3. The maximum absorbance is reached with thiocyanate concentrations greater than 0.36 mol l⁻¹.

The concentration and pH of the reagent R1, employed for the reduction of nitrate to nitrite on the copperized cadmium column, was also evaluated. The pH needs to be alkaline for the reduction step, however, for the second reduction, nitrite to nitric oxide, the medium needs to be acidic. Therefore, different pHs of the reagent R1 were prepared in the range of 7.5–9.5. The results presented in Fig. 4 indicate that the best pH value is about 8.5. At this pH, the maximum absorbance intensity from complex formation was observed with dilution of the reagent R1 1:100 v/v.

The optimum length of the cadmium copper reductor column was established by using a 3.0 mg l⁻¹ nitrate solution. Lengths of 5.0, 7.5, 10.0 and 12.0 cm were evaluated. The highest efficiency was achieved with a length of 7.5 cm. At lower lengths the reduction was not complete and at higher values dispersion in the FI system becomes significant. The lifetime of the cadmium copper reductor column depends on the matrix complexity. Furthermore the column could be regenerated as previously described.

The peak height on the diagram, which is proportional to the absorbance, depends on the residence time of the sample zone in the system, for example, on the total flow rate and the length of the reaction coil. The effect of the flow rate was checked over the range 0.6–2.4 ml min⁻¹ for each channel. The transient absorbance signals decreased as the flow rate increased. This indicates that the overall reaction is not instantaneous. At higher flow rates the residence time of the reagent is decreased. The best analytical conditions were obtained with flow rates of 1.2 ml min⁻¹ for each channel.

The influence of the reaction coil length on sensitivity was studied at a constant flow rate of 1.2 ml min⁻¹ (Fig. 5). By increasing the length of the reaction coil

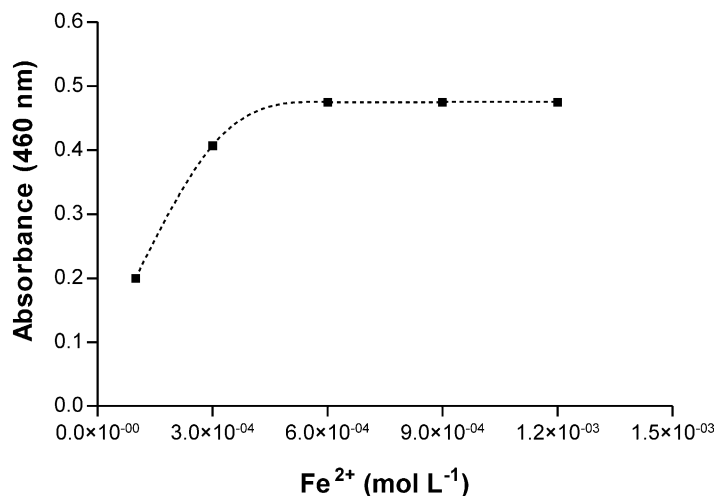


Fig. 2. Effect of Fe(II) concentration on FeSCNNO⁺ formation. Conditions: SCN⁻ 0.24 mol l⁻¹; R1: 1:100 v/v (pH=8.0) and NO₃⁻ : 3 mg l⁻¹.

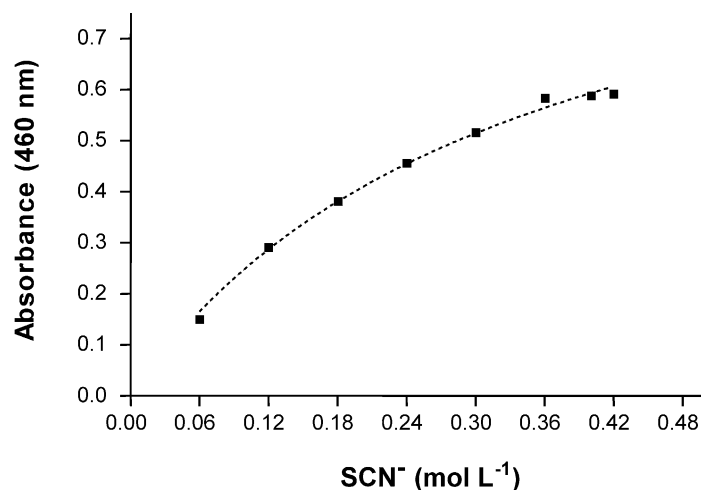


Fig. 3. Effect of thiocyanate concentration on FeSCNNO⁺ formation. Conditions: Fe²⁺: 6 10⁻⁴ mol l⁻¹ in 0.06 mol l⁻¹ H₂SO₄; NO₃⁻ : 3 mg l⁻¹ and R1: 1:100 v/v (pH = 8.0).

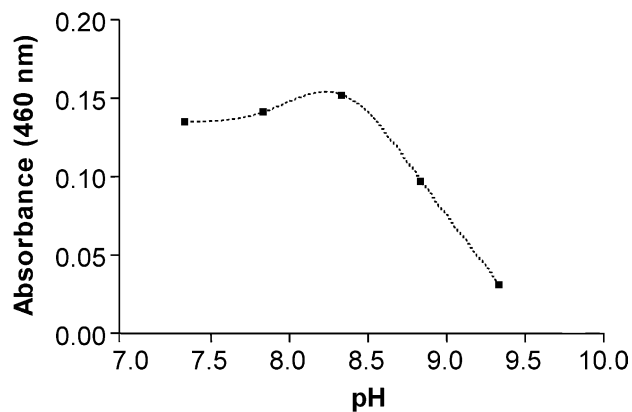


Fig. 4. Effect of pH of R1 on FeSCNNO⁺ formation. Conditions: Fe²⁺: 6 10⁻⁴ mol l⁻¹ in 0.06 mol l⁻¹ H₂SO₄; SCN⁻ : 0.36 mol l⁻¹ and NO₃⁻ : 3 mg l⁻¹.

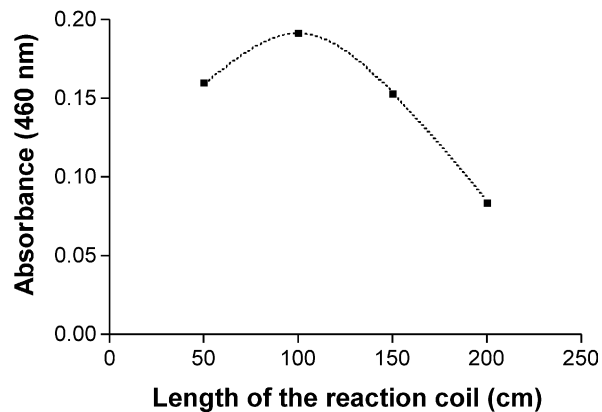


Fig. 5. Effect of the length of the reaction coil of the FeSCNNO⁺ formation. Conditions: Fe²⁺: 6 10⁻⁴ mol l⁻¹ in 0.06 mol l⁻¹ H₂SO₄; SCN⁻: 0.36 mol l⁻¹; NO₃⁻: 3 mg l⁻¹, R1: 1:100 v/v (pH=8.5).

from 50 to 100 cm an increase in the transient absorbance signal was observed due to the longer residence time for the reaction mixture. Furthermore, a reaction coil longer than 100 cm decreases the absorbance at 460 nm and peak broadening was observed. Thus a 100 cm reaction coil was selected for the method.

Thus, the optimum FI-conditions were attained with the following parameters: sample loop: 300 μL , length/diameter of the cadmium copper reductor column: 7.5/0.3 cm; reaction coil: 100 cm; R1: $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + \text{Na}_2\text{EDTA}$, pH 8.5 (flow rate 1.2 ml min^{-1}); R2: $\text{Fe}^{2+} / \text{H}_2\text{SO}_4$: $6 \cdot 10^{-4} / 0.06 \text{ mol l}^{-1}$ (flow rate 1.2 ml min^{-1}); R3: SCN^- 0.4 mol l^{-1} (flow rate 1.2 ml min^{-1}).

Under these conditions, calibration graphs linear over the concentration range of 1–10 and 0.30–3 mg l^{-1} for nitrate and nitrite, respectively, were obtained. The typical transient absorbance signals are illustrated in Fig. 6.

The sampling rate comprises 30 and 40 h^{-1} for nitrate and nitrite, respectively. The repeatability ($n=6$), expressed by *within-run-precision*, were 1.2 and 1.0% for 3 nitrate and 1.5 mg kg^{-1} nitrite, respectively.

3.2. Validation

The proposed method was validated by comparison with the AOAC recommended method, employing the Griess reaction (AOAC, 1997) in a FI system (Viana, Migotto, Reyes, & Rath, 2000) by the quantification of nitrate in different vegetable matrices (lettuce, arugula and watercress) and nitrate and nitrite determination in cured meats (pork sausage and hot-dogs). The results are presented in Table 1.

For the different matrices of fresh vegetables the nitrate content varied from 1619 to 8778 mg kg^{-1} . For the cured meat products the levels determined were in the range of 39–86 mg kg^{-1} and lower than 4–77 mg

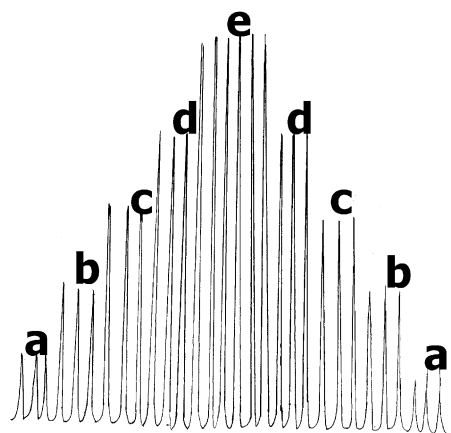


Fig. 6. Transient absorbance signals obtained for reference solutions. Nitrate concentration (mg l^{-1}): (a) 1.00; (b) 2.00; (c) 3.00; (d) 4.00 and (e) 5.00. Conditions: Fe^{2+} : $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ in 0.06 $\text{mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$; SCN^- : 0.36 mol l^{-1} and R1: 1:100 v/v (pH = 8.5).

Table 1

Results for the determination of nitrite and nitrate in food samples^a

Samples	Content of nitrite + ts_{x0} (mg kg^{-1})		Content of nitrate + ts_{x0} (mg kg^{-1})	
	Proposed method	Griess method	Proposed method	Griess method
<i>Pork sausage</i>				
1	n.d.	n.d.	86 ± 6	83 ± 4
2	39 ± 3	41 ± 3	59 ± 3	59 ± 5
3	n.d.	n.d.	84 ± 2	84 ± 3
<i>Hot-dog sausage</i>				
4	26 ± 5	28 ± 5	58 ± 6	56 ± 4
5	77 ± 5	76 ± 3	39 ± 5	38 ± 3
6	27 ± 3	28 ± 3	40 ± 5	43 ± 3
<i>Lettuce</i>				
7	n.d.	n.d.	1978 ± 180	1977 ± 139
8	n.d.	n.d.	2044 ± 181	2066 ± 141
9	n.d.	n.d.	1619 ± 183	1706 ± 140
<i>Watercress</i>				
10	n.d.	n.d.	4802 ± 47	4827 ± 220
<i>Arugula</i>				
11	n.d.	n.d.	8740 ± 79	8778 ± 370

^a S_{x0} = standard deviation of the mean value (5 determinations) of the concentration of nitrate and nitrite. $t = t$ -distribution for confidence interval of 95% with ($n-2$) degrees of freedom. n.d.: not detected (lower than 4 mg kg^{-1}).

kg^{-1} for nitrate and nitrite, respectively (Table 1). Those levels determined in cured meat products were in accordance with Brazilian food laws (MS, 1988) Independent of the matrix, the mean values obtained by the proposed method and the AOAC recommended method did not differ significantly ($P < 0.05$). The recovery of nitrate in the matrices varied from 93 to 110% and nitrite from 88 to 97% for the proposed method. The *between-run-precision* over 5 days was 2.3 and 5.5% for 242 nitrate and 19.7 mg kg^{-1} nitrite, respectively. Considering a sample of 5.0 g, the determination limit was 20.0 and 13.0 mg kg^{-1} of nitrate and nitrite, respectively.

4. Conclusion

The proposed flow injection spectrophotometric methodology was shown to be suitable for food quality control for simultaneous nitrate and nitrite determination in vegetables and meat products. The method offers advantage of being simple with a high analytical sampling rate, requiring low cost equipment and reagents and dispenses the need for carcinogenic reagents, which are employed by the recommended AOAC methodology (Griess reaction).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from FAPESP and CAPES, Brazil.

References

- AOAC (1997). *Official methods of analysis* (16th ed.). Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists.
- Bertotti, M., & Pletcher, D. (1997). Amperometric determination of nitrite via reaction with iodide using microelectrodes. *Analytica Chimica Acta*, 337, 49–55.
- Binkered, E. F., & Kolari, O. E. (1975). The history and use of nitrite and nitrate in the curing of meat. *Food and Cosmetics Toxicology*, 13, 655–661.
- Butt, S. B., Riaz, M., & Iqbal, M. Z. (2001). Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair liquid chromatography. *Talanta*, 55, 789–797.
- Giné, M. F., Bergamin, F. H., Zagatto, E. A. G., & Reis, B. F. (1980). Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 114, 191–197.
- Kawakami, T., & Igrashi, S. (1996). 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.
- Koupparis, M. A., Walczak, K. M., & Malmstadt, H. V. (1982). Kinetic determination of nitrite in water by using a stopped-flow analyzer. *Analyst*, 107, 1309–1315.
- Lara, W. H., Takahashi, M. Y., & Silveira, N. (1978). Determination of nitrites and nitrates in cured meat. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 38(2), 161–166.
- Li, J. Z., Wu, X. C., Yuan, R., Lin, H. G., & Yu, R. Q. (1994). Cobalt phthalocyanine derivatives as neutral carriers for nitrite-sensitive poly (vinyl chloride) membrane electrodes. *Analyst*, 119(6), 1363–1366.
- Liang, B., Iwatsuki, M., & Fukasawa, T. (1994). Catalytic spectrophotometric determination of nitrite using the chlorpromazine hydrogen-peroxide redox reaction in acetic-acid medium. *Analyst*, 119(9), 2113–2117.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Great Britain (MAFF). (1992). *Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in food: second report*. Food Surveillance. Paper 32.
- Ministério da Saúde do Brasil (MS). (1998). *Regulamento Técnico de Atribuição de Função de Aditivos, e seus Limites Máximos de Uso para a Categoria 8- Carne e Produtos Cárneos*. Portaria no. 1002/1004, de 11/12/98. Brasília, DF.
- Ötze, N., Nutku, M. S., & Erim, F. B. (2002). Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 76, 103–106.
- Schaller, U., Bakker, E., Spichiger, U. E., & Pretsch, E. (1994). Nitrite-selective microelectrodes. *Talanta*, 41, 1001–1005.
- Siu, D. C., & Henshall, A. (1998). Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in meat products. *Journal of Chromatography A*, 804, 157–160.
- Usher, C. D., & Telling, G. M. (1975). Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26, 1793–1805.
- Van Staden, J. F. (1982). Automated simultaneous determination of nitrate and nitrite by pre-valve reduction of nitrate in a flow-injection system. *Analytica Chimica Acta*, 138, 403–408.
- Viana, C. O., Migotto, G., Reyes, F. G. R., & Rath, S. (2000). *Determinação de nitrato em vegetais em sistema de análise por injeção em fluxo*. VII Encontro Nacional sobre contaminantes inorgânicos e II Simpósio sobre essencialidade de elementos na nutrição humana. ITAL- Campinas. p. 91.
- Ximenes, M. I. N., Rath, S., & Reyes, F. G. R. (2000). Polarographic determination of nitrate in vegetables. *Talanta*, 51, 49–56.