

KAREN CRISTINA ALMEIDA FRANCISCO

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos utilizando SALLE (*salting-out assisted liquid-liquid extraction*) para extração de aminas biogênicas e aldeídos de matrizes de alimentos

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso
Coorientador: Prof. Dr. Luís Moreira Gonçalves

Araraquara
2022

F819d	Francisco, Karen Cristina Almeida Desenvolvimento e validação de métodos analíticos utilizando SALLE (salting-out assisted liquid-liquid extraction) para extração de aminas biogênicas e aldeídos de matrizes de alimentos / Karen Cristina Almeida Francisco. -- Araraquara, 2022 230 f. : il. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientador: Arnaldo Alves Cardoso Coorientador: Luis Moreira Gonçalves 1. Extração por solventes. 2. Alimentos - Análise. 3. Preparo de amostras (Química). 4. Aminas. 5. Aldeídos. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Desenvolvimento e validação de métodos analíticos utilizando SALLE (salting-out assisted liquid-liquid extraction) para extração de aminas biogênicas e aldeídos de matrizes de alimentos"

AUTORA: KAREN CRISTINA ALMEIDA FRANCISCO

ORIENTADOR: ARNALDO ALVES CARDOSO

COORIENTADOR: LUÍS FRANCISCO MOREIRA GONÇALVES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ARNALDO ALVES CARDOSO (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica FísicoQuímica e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP – Araraquara



Profª. Drª. MARIA BEATRIZ DE ABREU GLÓRIA (Participação Virtual)
Departamento de Produtos Farmacêuticos / Faculdade de Farmácia - UFMG - Belo Horizonte



Profª. Dra. SUSANNE RATH (Participação Virtual)
Instituto de Química - UNICAMP – Campinas



Profª. Drª. HELENA TEIXEIRA GODOY (Participação Virtual)
Departamento de Ciência de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP – Campinas



Profª. Dra. IVANA CESARINO (Participação Virtual)
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP - Botucatu

Araraquara, 08 de abril de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Karen Cristina Almeida Francisco
Nome em citações bibliográficas: FRANCISCO, K. C. A; ALMEIDA, K. C;
FRANCISCO, K. C.;
e-mail: karen.almeida@unesp.br

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Laboratório de Química Analítica Ambiental
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica
Instituto de Química
UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Rua Prof. Francisco Degni, nº55
Araraquara – SP
CEP: 14800-060
Telefone: 16 3301-9600 (ramal 9736)

FORMAÇÃO ACADÊMICA

03/2017 – 04/2022 Doutorado em Química
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, Brasil
Título: Desenvolvimento e validação de métodos analíticos utilizando SALLE (*salting-out assisted liquid-liquid extraction*) para extração de aminas biogênicas e aldeídos de matrizes de alimentos
Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso
Coorientador: Dr. Luís Moreira Gonçalves
Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

09/2017 – 08/2018 Doutorado Sanduíche
Universidade do Porto, Porto, Portugal
Grupo de Química Analítica e Qualidade Alimentar
Supervisor no exterior: Prof. Dr. José Antônio Maia Rodrigues
Bolsa: CAPES/FCT

03/2015 – 02/2017

Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, Brasil

Título: Avaliação da composição química e dos processos de transformação gás/partícula do aerossol atmosférico em uma região litorânea sob influência industrial no estado de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Martins Costa

Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

03/2010 – 01/2015

Graduação em Química

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, Brasil

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de sulfito livre em bebidas

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso

Colaborador: MSc. Juliano Passaretti-Filho

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Estágio de docência

02/2019 – 06 /2019

Disciplina: Química Analítica Qualitativa (prática)

Curso: Engenharia Química

Supervisor: Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso

Carga horária: 60 horas

Minicursos

2019

Química Forense: novos métodos analíticos aplicados na análise de drogas (6 horas)

Sociedade Brasileira de Química

2019

Perspectivas da Química Analítica e de Produtos Naturais em Alimentos e Saúde (6 horas)

Sociedade Brasileira de Química

2016

Emprego de técnicas quimiomiméticas e de planejamento fatorial (6 horas)

Encontro Nacional de Química Analítica

2015

A atuação do químico em perícias ambientais (6 horas)

Sociedade Brasileira de Química

2013	Cosméticos (12 horas) Instituto de Química, UNESP, Araraquara
2010	Biomateriais: uma visão contemporânea (20 horas) Instituto de Química, UNESP, Araraquara

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos submetidos para periódicos

1. **FRANCISCO, K. C. A.**; LOBATO, A.; TASIĆ, N.; CARDOSO, A. A.; GONÇALVES, L. M. Determination of 5-hydroxymethylfurfural using an electropolymerized molecularly imprinted polymer in combination with SALLE. **Talanta**, 2022.
2. **FRANCISCO, K. C. A.**; COSTA, M. A. M.; CARDOSO, A. A. Aerosol and gases in an atmospheric coastal region close to a trade oil and gas hub: temporal variations, transport, and regional impacts. **Water, Air & Soil Pollution**, 2022.

Artigos completos publicados em periódicos

1. **FRANCISCO, K. C. A.**; BRANDÃO, P. F.; RAMOS, R. M.; GONÇALVES, L. M.; CARDOSO, A. A.; RODRIGUES, J. A. Salting-out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) with dansyl chloride for the determination of biogenic amines in food. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 1, p. 248-258, 2020.
2. SOUZA, P. A. F.; **FRANCISCO, K. C. A.**; CARDOSO, A. A. Development of sensitive passive sampler for nitrogen dioxide air pollution monitoring. **Química Nova**, n. 40, v. 10, p. 1233-1237, 2017.

Trabalhos apresentados na forma de pôster em eventos científicos

1. **FRANCISCO, K. C. A.**; COSTA, M. A. M.; CARDOSO, A. A. Evaluation of chemical composition and process involving gas to particle transformation in a coastal area under industrial influence in São Paulo. *XIV Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry*, Bento Gonçalves, Brasil, 2019.
2. BRAGA, A. L. R.; **FRANCISCO, K. C. A.**; CARDOSO, A. A. Validação e aplicação da técnica SALLE para determinação de amins biogênicas em produtos alimentares de origem animal. *XXXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP*, Araraquara, Brasil, 2019.
3. PEREIRA, L. B.; **FRANCISCO, K. C. A.**; CARDOSO, A. A. Determinação de sulfito em vinho e alimentos por micro extração por difusão gasosa: utilizando método colorimétrico Fe (III) - fenantrolina. *XXXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP*, Araraquara, Brasil, 2019.

4. **FRANCISCO, K. C. A.**; BRANDÃO, P. F.; RAMOS, R. M.; GONÇALVES, L. M.; CARDOSO, A. A.; RODRIGUES, J. A. Aplicação da técnica SALLE-HPLC-UV/FD para determinação de aminas biogênicas em produtos alimentares de origem animal. *42ª Reunião Anual da Sociedade da Sociedade Brasileira de Química*, Joinville, Brasil, 2019.
5. PEREIRA, L. B.; **FRANCISCO, K. C. A.**; CARDOSO, A. A. Determination analysis of sulfites in wine and food by gas-diffusion microextraction: using spectrophotometric iron o-phenantroline method. *42ª Reunião Anual da Sociedade da Sociedade Brasileira de Química*, Joinville, Brasil, 2019.
6. **ALMEIDA, K. C.**; RAMOS, R. M.; BRANDÃO, P. F.; GONÇALVES, L. M.; CARDOSO, A. A.; RODRIGUES, J. A. A SALLE methodology for biogenic amines determination on food products of from animal origin. *9th Meeting of Analytical Chemistry Division*, Porto, Portugal, 2018.
7. **ALMEIDA, K. C.**; BRANDÃO, P. F.; RAMOS, R. M.; GONÇALVES, L. M.; CARDOSO, A. A.; RODRIGUES, J. A. Aplicação da metodologia SALLE para a determinação de aminas biogênicas em produtos alimentares de origem animal, *10º Encontro Nacional de Cromatografia*, Bragança, Portugal, 2018.
8. BORDIN, I. O.; COSTA, M. A. M.; **FRANCISCO, K. C. A.**; PASSARETTI-FILHO, J.; CARDOSO, A. A. Amostragem passiva da concentração de ozônio em ambientes internos e externos de creches. *18º Encontro Nacional de Química Analítica*, Florianópolis, Brasil, 2016.
9. **FRANCISCO, K. C. A.**; COSTA, M. A. M.; CARDOSO, A. A. Caracterização química do aerossol de Caraguatatuba como forma de avaliar impactos de atividades antrópicas na região litorânea. *18º Encontro Nacional de Química Analítica*, Florianópolis, Brasil, 2016.
10. SANTOS, G. S.; **FRANCISCO, K. C.**; CARDOSO, A. A.; Determinação de dióxido de enxofre pelo método de cloraniliato de bário. *XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP*, Araraquara, Brasil, 2016.
11. SANTOS, G. S.; **FRANCISCO, K. C.**; CARDOSO, A. A.; Determinação de dióxido de enxofre pelo método de cloraniliato de bário. *39ª Reunião Anual da Sociedade da Sociedade Brasileira de Química*, Goiânia, Brasil, 2016.
12. SOUZA P. A. F.; **FRANCISCO, K. C. A.**; CARDOSO, A. A.; Construção de amostrador passivo de baixo custo para determinação de dióxido de nitrogênio. *39ª Reunião Anual da Sociedade da Sociedade Brasileira de Química*, Goiânia, Brasil, 2016.
13. **FRANCISCO, K. C. A.**; PASSARETTI-FILHO, J.; CARDOSO, A. A. Desenvolvimento de método analítico para determinação de sulfito livre em bebidas. *38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Águas de Lindóia, Brasil, 2015.

14. **FRANCISCO, K. C. A.**; PASSARETTI-FILHO, J.; CARDOSO, A. A. Desenvolvimento de método simples utilizando scanner de mesa para determinação de sulfito em vinho branco. *17º Encontro Nacional de Química Analítica*, Belo Horizonte, Brasil, 2013.

15. **FRANCISCO, K. C. A.**; PASSARETTI-FILHO, J.; CARDOSO, A. A. Desenvolvimento de método simples utilizando scanner de mesa para determinação de sulfito em vinho branco. *XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP – 2ª fase*, Barra Bonita, Brasil, 2013.

16. **FRANCISCO, K. C. A.**; PASSARETTI-FILHO, J.; CARDOSO, A. A. Desenvolvimento de método simples utilizando scanner de mesa para determinação de sulfito em vinho branco. *XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP – 1ª fase*, Araraquara, Brasil, 2013.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. **XIV Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry**, Bento Gonçalves-RS, Brasil, 6 a 8 de novembro de 2019. (Simpósio)
2. **42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Joinville-SC, Brasil, 27 a 30 de maio de 2019. (Congresso)
3. **9th Meeting of Analytical Chemistry Division**, Porto, Portugal, 26 a 27 de março de 2018. (Encontro)
4. **18º Encontro Nacional de Química Analítica**, Florianópolis-SC, Brasil, 19 a 21 de setembro de 2016. (Encontro)
5. **38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, Brasil, 25 a 28 de maio de 2015. (Congresso)
6. **Workshop**: Ano Internacional da Luz – IYL 2015, Araraquara-SP, Brasil, 5 de março de 2015. (Workshop)
7. **XXV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP e I Fórum Internacional de Iniciação Científica da UNESP**, Barra Bonita-SP, Brasil, 10 a 12 de novembro de 2013. (Congresso)
8. **17º Encontro Nacional de Química Analítica**, 6 a 9 de outubro de 2013, Belo Horizonte-MG, Brasil. (Encontro)
9. **XLIII Semana da Química**, Araraquara-SP, Brasil, 21 a 15 de outubro de 2013. (Outra)
10. **XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 25 de setembro de 2013, Araraquara-SP – Brasil. (Congresso)
11. **40ª Semana da Química**, Araraquara-SP, Brasil, 26 de setembro a 01 de outubro de 2010. (Outra)

PRÊMIOS

- 2019** 3º melhor pôster apresentado por um jovem cientista no XIV Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry, Bento Gonçalves – RS, Brasil.

SUPERVISÃO CIENTÍFICA

Iniciação Científica

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil

Título do Projeto: Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de aminas biogênicas em produtos alimentares de origem animal

Aluno: Arthur Longo Roger Braga (Graduando em Engenharia Química, Insituto de Química – UNESP, Araraquara).

Bolsista: PIBIC/CNPq Pró-Reitoria; período: agosto de 2019 a agosto de 2021.

OUTRAS ATIVIDADES ACADÊMICAS

Participação em banca de comissão julgadora

1. XXXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2021
Universidade Estadual Paulista
2. XXXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2020
Universidade Estadual Paulista

Participação em órgãos colegiados

10/2019 – 02/2022 Representante discente	Comissão de Ética Ambiental (titular) Instituto de Química, UNESP - Araraquara
10/2019 – 10/2020 Representante discente	Conselho de Pós Graduação da Química (suplente) Instituto de Química, UNESP - Araraquara
10/2018 – 10/2019 Representante discente	Conselho de Pós Graduação da Química (titular) Instituto de Química, UNESP - Araraquara
10/2018 – 10/2019 Representante discente	Congregação do Instituto de Química (suplente) Instituto de Química, UNESP - Araraquara

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado saúde e direcionamento para alcançar mais um objetivo da minha vida e por abrilhantar esse percurso com tantos momentos bons e pessoas incríveis.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso pela oportunidade de realizar o doutorado e por sua orientação na construção desse trabalho. É uma honra ter tido tantos anos de convivência pacífica, produtiva e cheia de aprendizados.

Ao Prof. Dr. Luís Moreira Gonçalves por todo o interesse e disponibilidade oferecidos na coorientação desse trabalho, pela oportunidade de realizar trabalhos experimentais com seu grupo e pela sua hospitalidade.

A todos que estiveram presentes no grupo de Química Analítica Ambiental durante esse período: Carol, José, Juliano, João, Michele, Lucas, Marcos e Arthur; pela convivência, aprendizados e prontidão em sempre ajudar no que fosse possível.

Ao Prof. Dr. José Antônio Maia Rodrigues e aos integrantes do grupo de Qualidade Alimentar e Química Analítica da Universidade do Porto por me receberem tão gentilmente durante o período de intercâmbio e proporcionarem grande crescimento profissional e aprendizado.

Ao pessoal do grupo de pesquisa LMG da Universidade de São Paulo, Alnilan, Nikola, Ingrid, Heitor, William, Bruna, Alisson e Leticia por todo auxílio e agradável convivência.

À Profa. Dr. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor (UNESP) e ao Prof. Dr. Pedro Vidinha (USP) pela disponibilidade do equipamento de HPLC e aos alunos de doutorado Rafael e Maitê por toda ajuda com sua operação.

Ao Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes e a Profa. Dra. Wanessa Melchert Mattos pelas contribuições durante a banca de qualificação.

À Profa. Dra. Maria Angélica Martins Costa pela amizade e por toda gentileza e generosidade em me acolher no início dessa jornada.

Aos meus pais, Marcia e José Luis, por investirem na minha educação, pelo amor, apoio e dedicação para que pudesse chegar até aqui.

Aos meus avós, tios, primos e irmãos por todo incentivo e por sempre torcerem por mim.

Aos amigos que esse percurso acadêmico me proporcionou e que me acompanharam mais de perto em diferentes momentos: Fernanda (Mirna), Fabi, Jade, Glauber, Veri, Júlia (Corre), Maria Clara (Pliê), Roberta (Bambi), Max, Vitor, João Lucas, Erika, Saidy, Hernan, Victor, Marcelão, Débora, Brenda e Paloma (Chemp), pelo apoio, carinho e compreensão nas horas difíceis e por tornarem esse percurso mais leve e divertido.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação e da Biblioteca, em especial Wennia, Valéria, Robson, Ana Carolina, Bel, Catia, Paul, Ana Paula pelo suporte técnico e esclarecimentos e por toda paciência nos atendimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida e pelo apoio à Pós-Graduação do Instituto de Química.

Novamente à CAPES, e também à Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT), pela bolsa de doutorado-sanduíche no exterior concedida através do Programa CAPES/FCT edital 039/2014.

À FAPESP, através do financiamento de pesquisa de número 18/14425-7 durante período na Universidade de São Paulo.

Ao Instituto de Química e seus colaboradores pela disponibilização da infraestrutura e por todo suporte fornecidos para o desenvolvimento desse trabalho e ao longo de 12 anos em que estive no Instituto.

A todos aqueles que estiveram envolvidos e de alguma maneira colaboraram para a realização desse trabalho.

*“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas
dificuldades que superou no caminho.”*

(Abraham Lincoln)

RESUMO

O preparo de amostras é uma etapa fundamental na determinação de espécies químicas de amostras complexas, sendo uma etapa importante quando se determina analitos que estão presentes em baixas concentrações. O preparo pode combinar a extração dos analitos com a sua pré-concentração, resultando em menor interferência da matriz e aumentando a intensidade do sinal analisado. A extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE) é uma técnica que combina líquidos parcialmente miscíveis e pode fornecer alta eficiência de separação dos analitos para uma das fases. Entre suas principais qualidades, destacam-se a fácil execução e baixo custo. Nesse trabalho, SALLE foi utilizada para a extração de aminas biogênicas (ABs) de produtos alimentares de origem animal e para a extração de aldeídos de amostras de café. ABs são formadas, principalmente, pela descarboxilação enzimática microbiana de aminoácidos em alimentos que contêm proteínas ou aminoácidos livres e são comuns em diversos alimentos e bebidas. Condições higiênicas precárias durante o processamento e armazenamento dos alimentos propiciam um aumento de atividade microbiana e favorecem a formação e o acúmulo das ABs, assim a concentração de ABs pode ser um indicador de qualidade do alimento. O café é um alimento amplamente consumido. Durante a etapa de torrefação do café, o 5-hidroxi-2-metilfurfural (HMF) é um dos principais produtos formados como resultado da elevada temperatura. Aldeídos também são uma das principais classes de compostos presentes na fração volátil do café e podem auxiliar na distinção de suas características organolépticas, além de fornecer informações à respeito dos processamentos a que ele foi submetido. Na determinação de ABs, a SALLE foi realizada simultaneamente com a derivatização das aminas com cloreto de dansila (DNS-Cl), reduzindo as etapas de tratamento de amostra. A quantificação das ABs foi realizada por HPLC com detectores ultravioleta e fluorescência. Após validado, o método foi aplicado para análise de ABs em amostras de peixes e carnes. Para análise de HMF, a SALLE foi combinada com um sensor eletroquímico baseado em um polímero molecularmente impresso (MIP). As determinações analíticas foram feitas por voltametria de pulso diferencial. Nesse procedimento, o MIP foi produzido pela eletropolimerização de ácido *p*-aminobenzóico na superfície de um eletrodo de carbono vítreo. Os parâmetros do MIP e da SALLE foram otimizados e o método proposto foi aplicado para análise de amostras de café em pó e café instantâneo. Para determinação dos aldeídos voláteis do café (formaldeído, acetaldeído e 2-furfural), foi inicialmente realizada uma microextração por difusão gasosa (GDME). Na sequência, na amostra contendo os voláteis, foi aplicada uma SALLE, combinada com a derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e detecção dos aldeídos por HPLC-UV. Em todos os procedimentos propostos foram avaliadas as figuras de mérito analítico. As curvas de calibração forneceram coeficientes de determinação maiores do que 0,99 para todos os analitos, as repetibilidades e reprodutibilidades foram menores do que 13 % e 14 %, respectivamente, e as recuperações ficaram entre 80 % e 115 %. A SALLE mostrou ser eficiente como método para tratamento de amostras de alimentos, proporcionando uma alta seletividade e sensibilidade para as determinações analíticas de matrizes complexas.

Palavras-chave: *salting-out*; extração; preparo de amostras; aminas biogênicas; aldeídos.

ABSTRACT

Sample treatment is a crucial step to determine chemical species from complex samples, being particularly important for determine analytes that are present in low levels. The treatment can combine the extraction of analytes and their pre concentration, this way promoting a decrease in the interference from the matrix and an increase in the intensity of the signal that are being analyzed. Salting-out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) is a technique that combines partially miscible liquids and is able to provide high separation efficiency of analytes and high enrichment factors. Important advantages are related to be easy to perform and an inexpensive technique. In this work, SALLE was used for the extraction of biogenic amines from food products of animal origin and for the extraction of aldehydes from coffee samples. Biogenic amines are formed through microbial decarboxylation of amino acids in foods that contain protein and amino acids and are common in many foods and beverages. Precarious hygienic conditions during food process and storage can promote an increase in microbial activity and to favor the formation and accumulation of biogenic amines. Therefore, the concentration of biogenic amines can be an indicator of food quality. Coffee is a widely consumed product. During the coffee roasting step, 5-hidroxymethylfurfural (HMF) is one of the main products formed as a result of the high temperatures. Aldehydes are also one of the main classes of compounds present in the volatile fraction of coffee and can help to distinguish its organoleptic characteristics; in addition, their concentration provide information about the processing to which coffee has been submitted. For the determination of biogenic amines, SALLE was performed simultaneously with the derivatization of amines with dansyl chloride (DNS-Cl), reducing the sample treatment steps. The quantification of biogenic amines was performed by HPLC with ultraviolet (UV) and fluorescence detectors. After validated, the method was applied for analysis of biogenic amines in fish and meat samples. For HMF analysis, SALLE was combined with the development of an electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymers (MIP). Analytical determinations were performed by differential pulse voltammetry. In this procedure, MIP was produced by electropolymerization *p*-aminobenzoic acid on the surface of a glassy carbon electrode. The MIP and SALLE parameters were optimized and the proposed method was applied to the analysis of samples of powered and instant coffee. To determine the volatile aldehydes in coffee (formaldehyde, acetaldehyde and 2-furfural), a gas diffusion microextraction (GDME) was initially performed. Then, on the phase containing the volatiles, SALLE was applied, combined with derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and detection of aldehydes by HPLC-UV. In all the proposed procedures, figures of analytical merits were evaluated. Calibration curves provided determination coefficients greater than 0,99 for all analytes. Repeatability and reproducibility were less than 13 % and 14 %, respectively, and recoveries were in the range of 80 % and 115 %. SALLE provided to be efficient as a method for treating food samples, providing high selectivity and sensitivity factors for analytical determination in complex matrices.

Keywords: salting-out; extraction; sample treatment; biogenic amines; aldehydes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do procedimento de SALLE	36
Figura 2 – Principais rotas biossintéticas para a formação de aminas biogênicas ...	55
Figura 3 – Principais rotas biossintéticas para a formação de putrescina	56
Figura 4 – Reação de degradação da histamina	58
Figura 5 – Formação de nitrosaminas	60
Figura 6 – Reagentes de derivatização de aminas biogênicas mais utilizados	74
Figura 7 – Representação esquemática do procedimento experimental proposto para extração de aminas biogênicas	80
Figura 8 – Representação da reação de cloreto de dansila (DNS-Cl) com aminas..	81
Figura 9 – Área do pico dos derivatizados das aminas biogênicas obtidos pelo detector fluorescência após processo de lixiviação da amostra sob diferentes condições	84
Figura 10 – Cromatograma de uma solução padrão contendo todas as aminas biogênicas em concentração de 20 mg L ⁻¹	85
Figura 11 – Curva analítica para (a) metilamina e (b) etilamina obtidas por detector UV e FL	86
Figura 12 – Curva analítica para (a) dimetilamina e (b) isopentilamina obtidas por detector UV e FL	86
Figura 13 – Curva analítica para (a) 2-feniletilamina e (b) putrescina obtidas por detector UV e FL	87
Figura 14 – Curva analítica para (a) cadaverina e (b) histamina obtidas por detector UV e FL	87
Figura 15 – Curva analítica para (a) tiramina e (b) espermidina obtidas por detector UV e FL	87
Figura 16 – Curva analítica para espermina obtida por detector UV e FL	88
Figura 17 – Concentração de ABs nas amostras à base de peixe armazenadas à - 4 °C ao longo de 7 dias	92
Figura 18 – Concentração de ABs nas amostras à base de peixe armazenadas à 4 °C ao longo de 7 dias: (a) cadaverina, (b) cadaverina na amostra de sardinha, (c) tiramina na amostra de sardinha e (d) histamina	93
Figura 19 – Concentração de ABs nas amostras à base de peixe armazenadas à 4 °C ao longo de 7 dias:	94

Figura 20 – Concentração de ABs nas amostras à base de peixe armazenadas à 22 °C ao longo de 7 dias:	97
Figura 21 – Concentração de ABs nas amostras à base de peixe armazenadas à 22 °C ao longo de 7 dias:	98
Figura 22 – Concentração de ABs nas amostras à base de carne armazenadas à - 4 °C ao longo de 7 dias:	101
Figura 23 – Concentração de ABs nas amostras à base de carne armazenadas à 4 °C ao longo de 7 dias:	102
Figura 24 – Concentração de ABs nas amostras à base de carne armazenadas à 22 °C ao longo de 7 dias: (a) cadaverina, (b) putrescina, (c) espermidina) e (d) espermina	104
Figura 25 – Concentração de ABs nas amostras à base de carne armazenadas à 22 °C ao longo de 7 dias: (a) tiramina e (b) histamina.....	105
Figura 26 – Formação de sulfonato de <i>p</i> -fenildiazônio.....	109
Figura 27 – Relação da absorbância com o tempo de reação entre histamina e sulfonato de <i>p</i> -fenildiazônio.....	110
Figura 28 – Curva de calibração e curva com adição de padrão obtidas da reação de histamina com sulfonato de <i>p</i> -fenildiazônio.....	111
Figura 29 – Reação de derivatização entre DNPH e aldeídos	124
Figura 30 – Esquema do dispositivo de extração do GDME. (a) parte superior, (b) membrana, (c) parte inferior, (d) amostra, (e) frasco, (f) agitador magnético, (g) chapa de aquecimento	128
Figura 31 – Representação esquemática do sistema de microextração por difusão gasosa.....	133
Figura 32 – Produtos formados pela reação de FA, AA e 2-FAL com o reagente de derivatização DNPH	137
Figura 33 – Cromatograma da análise por HPLC-UV de solução padrão de 20 mg L ⁻¹ de FA, AA e 2-FAL extraídos por GDME e SALLE	138
Figura 34 – Escolha do solvente da fase doadora para a extração por GDME: (A) - água deionizada; (B) - PBS pH 7,4; (C) - etanol 12 % (v/v)	139
Figura 35 – Avaliação da etapa SALLE para tratamento da amostra após extração de FA, AA e 2-FAL por GDME: (A) - 50 mg L ⁻¹ dos aldeídos, sem SALLE; (B) - 20 mg L ⁻¹ dos aldeídos, com SALLE após a extração por GDME; (C) - 20 mg L ⁻¹ dos aldeídos, sem SALLE	140

Figura 36 – Área dos picos cromatográficos obtido para os eletrólitos utilizados na SALLE para extração de FA, AA, e 2-FAL	142
Figura 37 – Área dos picos cromatográficos obtido para diferentes quantidades de NaCl utilizadas na SALLE para extração de FA, AA e 2-FAL	142
Figura 38 – Análise dos resultados da área do pico cromatográfico dos aldeídos para diferentes temperaturas de extração adotadas para o procedimento GDME.....	144
Figura 39 – Áreas dos picos cromatográficos observadas para os diferentes tempos de extração adotados para o GDME	145
Figura 40 – Curva de calibração e curva com adição de padrão obtidas para a análise de formaldeído pelo método proposto.....	147
Figura 41 – Curva de calibração e curva com adição de padrão obtidas para a análise de acetaldeído pelo método proposto	148
Figura 42 – Curva de calibração e curva com adição de padrão obtidas para a análise de 2-furfural pelo método proposto	149
Figura 43 – Decomposição de açúcares em altas temperaturas para formação de HMF	158
Figura 44 – Representação esquemática da síntese de polímeros molecularmente impressos (MIP)	170
Figura 45 – Mecanismo de reação de <i>p</i> -ABA na superfície de eletrodos modificados	180
Figura 46 – Voltametria cíclica realizada para promover a eletropolimerização de <i>p</i> -ABA na superfície do GCE. (a) pico de oxidação do monômero, (b) E_{PA} do polímero, (c) E_{PC} do polímero.....	181
Figura 47 – Voltametria cíclica realizada para promover a eletropolimerização de <i>p</i> -ABA na superfície do GCE. (a) pico de oxidação do monômero, (b) E_{PA} do polímero, (c) E_{PC} do polímero, (d) pico de redução do HMF	182
Figura 48 – Oxidação e redução de HMF em meio ácido.....	183
Figura 49 – Voltamogramas obtidos pela análise em sonda redox. GCE: após limpeza do eletrodo com H_2SO_4 , GCE-MIP: após eletropolimerização, GCE-MIP-rt: após remoção do template, GCE-MIP-inc: após incubação do MIP em solução padrão de HMF	183

Figura 50 – DPV registrado de -1,3 V a -1,6 V para diferentes proporções entre as concentrações em mmol L ⁻¹ entre <i>template</i> :monômero (HMF: <i>p</i> -ABA)	185
Figura 51 – DPV registrado de -1,3 V a -1,6 V para MIP desenvolvido com diferentes números de ciclos voltamétricos	186
Figura 52 – DPV registrado de -1,3 V a -1,6 V para MIP desenvolvido com diferentes velocidades de varredura	188
Figura 53 – DPV registrado de -1,3 V a -1,6 V para MIP analisado após diferentes tempos de incubação	189
Figura 54 – Recuperações (%) obtidas utilizando diferentes massas de Na ₂ CO ₃ como eletrólito para SALLE e diferentes composições de volume dos solventes (ACN:PBS)	190
Figura 55 – Recuperações (%) obtidas utilizando diferentes massas de NaCl como eletrólito para SALLE e diferentes composições de volume dos solventes (ACN:PBS)	191
Figura 56 – Moléculas avaliadas como possíveis interferentes na análise de HMF pelo MIP	192
Figura 57 – Comparação entre os voltamogramas obtidos para a análise de 2-furfural e HMF pelo MIP proposto	193
Figura 58 – DPV registrado de -1,3 V a -1,6 V para diferentes concentrações de HMF determinadas pelo MIP proposto e curva de calibração construída com os valores de corrente dessas concentrações.....	194
Figura 59 – Comparação das curvas de calibração obtidas para a determinação de HMF pelo MIP e pelo NIP	195
Figura 60 – Comparação entre as curvas de calibração e curva com adição de padrão para o HMF	197

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros analíticos do método proposto determinados pelo detector UV	89
Tabela 2 – Parâmetros analíticos do método proposto determinados pelo detector FL	89
Tabela 3 – Índices para aminas biogênicas calculados conforme IAB_{MK} e IAB_{VN} ...	107
Tabela 4 – Programa de eluição utilizado para as separações cromatográficas dos aldeídos em HPLC-UV	134
Tabela 5 – Equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) obtidos pela curva de calibração e pela curva com adição de padrão	147
Tabela 6 – Resultados de repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação obtidos para os aldeídos analisados pelo método GDME-SALLE proposto ...	149
Tabela 7 – Concentrações de FA, AA e 2-FAL, em $mg\ kg^{-1}$, encontradas nas diferentes marcas e variedades de café extraídas por GDME e SALLE e analisadas por HPLC	151
Tabela 8 – Concentração de HMF nas amostras de café determinadas pelo método proposto	198

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Revisão da literatura de trabalhos que utilizaram SALLE para preparo de amostra	41
Quadro 2 – Índices de amins biogênicas sugeridos por diversos autores	69
Quadro 3 – Análise de amins biogênicas por HPLC.....	76
Quadro 4 – Técnicas de análise e procedimentos de extração reportados na literatura para determinação de HMF em matrizes alimentares	165

LISTA DE SIGLAS

2-FAL	2-furfural
AA	Acetaldeído
AB	Amina Biogênica
ACN	Acetonitrila
AGM	Agmatina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCP	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Processo
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAD	Cadaverina
CE	Eletroforese Capilar, do inglês <i>Capillary Electrophoresis</i>
CV	Voltametria Cíclica, do inglês <i>Cyclic Voltammetry</i>
DAO	Diaminaoxidase
DBS-Cl	Cloreto de dabsila
DIM	Dimetilamina
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DNS-Cl	Cloreto de dansila
DPR	Desvio Padrão Relativo
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial, do inglês <i>Differential Pulse Voltammetry</i>
DVA	Doenças Veiculadas por Alimentos
EFSA	Autoridade de Segurança Alimentar Européia, do inglês <i>European Food Safety Authority</i>
E_{PA}	Pico do Potencial Anódico
E_{PC}	Pico do Potencial Catódico
EQM	Eletrodos Quimicamente Modificados
ETI	Etilamina
FA	Formaldeído
FDA	Administração de Alimentos e Drogas, do inglês <i>Food and Drugs Administration</i>

FEN	2-feniletilamina
FL	Fluorescência
GC	Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
GCE	Eletrodo de Carbono Vítreo, do inglês <i>Glassy Carbon Electrode</i>
GDME	<i>Gas Diffusion Microextraction</i>
HF-LPME	Microextração em Fase Líquida com Fibra Porosa, do inglês <i>Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction</i>
HIM	Histamina
HMF	5-(hidroximetil)-2-furfural
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HS-SPME	Microextração em Fase Sólida com <i>Headspace</i> , do inglês <i>Headspace Solid Phase Microextraction</i>
IAB	Índice para Aminas Biogênicas
IAB_{MK}	Índice para Aminas Biogênicas de Mietz e Karmas
IAB_{vc}	Índice para Aminas Biogênicas de Veciana-Nogues
IHC	Comissão Internacional do Mel, do inglês <i>International Honey Commission</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	Organização Internacional para Padronização, do inglês <i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de Detecção
LLE	Extração Líquido-Líquido, do inglês <i>Liquid-liquid Extraction</i>
LPME	Liquid Phase Microextraction
LQ	Limite de Quantificação
MAO	Monoaminaoxidase
MET	Metilamina
MIP	Polímero Molecularmente Impresso, do inglês <i>Molecularly Imprinted Polymer</i>
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>

NASA	Administração Nacional Aeronáutica e Espacial, do inglês <i>National Aeronautics and Space Administration</i>
NIP	Polímero Molecularmente Não Impresso, do inglês <i>Non-Imprinted Polymer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPA	o-ftalaldeído
PBS	Solução Tampão de Fosfato, do inglês <i>Phosphate Buffer Solution</i>
PUT	Putrescina
SALLE	Extração Líquido-Líquido Assistida por <i>Salting-out</i> , do inglês <i>Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction</i>
SDME	Microextração por Gota Única, do inglês <i>Single Droplet Microextraction</i>
SPD	Espermidina
SPE	<i>Extração em Fase Sólida</i> , do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SPM	Espermina
SPME	<i>Microextração em Fase Sólida</i> , do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i>
SWV	<i>Voltametria de Onda Quadrada</i> , do inglês <i>Square Wave Voltammetry</i>
TRM	Triptamina
TIR	Tiramina
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1	Técnicas de preparo de amostras.....	30
2.1.1	<i>Extração líquido-líquido assistida por salting-out (SALLE)</i>	<i>35</i>
2.2	Validação de métodos analíticos	46
3	OBJETIVOS GERAIS	49
4	CAPÍTULO I – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA SALLE PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM PRODUTOS ALIMENTARES DE ORIGEM ANIMAL	50
4.1	Introdução	50
4.2	Revisão Bibliográfica	51
4.2.1	<i>Definição e classificação de aminos biogênicas.....</i>	<i>52</i>
4.2.2	<i>Formação de aminos biogênicas.....</i>	<i>53</i>
4.2.3	<i>Papel fisiológico das aminos biogênicas</i>	<i>56</i>
4.2.4	<i>Efeitos tóxicos das aminos biogênicas</i>	<i>57</i>
4.2.4.1	<i>Efeitos toxicológicos de aminos em animais</i>	<i>60</i>
4.2.5	<i>Produtos alimentares que contêm aminos biogênicas</i>	<i>61</i>
4.2.5.1	<i>Aminos biogênicas em peixes</i>	<i>62</i>
4.2.5.2	<i>Aminos biogênicas em carnes.....</i>	<i>64</i>
4.2.5.3	<i>Aminos biogênicas em alimentos destinados à animais.....</i>	<i>65</i>
4.2.6	<i>Limites regulatórios de aminos em alimentos.....</i>	<i>67</i>
4.2.7	<i>Aminos biogênicas como indicadores de qualidade alimentar</i>	<i>68</i>
4.2.8	<i>Formas de prevenir a formação de aminos biogênicas nos alimentos</i>	<i>69</i>
4.2.9	<i>Métodos de análise de aminos</i>	<i>70</i>
4.2.9.1	<i>Extração e derivatização</i>	<i>71</i>
4.2.9.2	<i>Técnicas instrumentais para determinação de aminos biogênicas.....</i>	<i>74</i>

4.3	Objetivos	78
4.4	Parte experimental	78
4.4.1	<i>Reagentes e soluções</i>	78
4.4.2	<i>Amostras</i>	79
4.4.3	<i>Procedimento de extração e derivatização.....</i>	80
4.4.4	<i>Análise por HPLC</i>	81
4.4.5	<i>Ensaio colorimétricos para determinação de histamina.....</i>	81
4.4.5.1	<i>Ensaio colorimétrico para determinação de histamina nas amostras de peixe</i>	82
4.5	Resultados e Discussão	83
4.5.1	<i>Otimização da etapa de extração ácida das amostras.....</i>	83
4.5.2	<i>Avaliação dos parâmetros analíticos do método</i>	85
4.5.3	<i>Ensaio de degradação das amostras</i>	90
4.5.3.1	<i>Aminas biogênicas em amostras a base de peixe.....</i>	90
4.5.3.2	<i>Aminas biogênicas em amostras à base de carne</i>	99
4.5.4	<i>Índice para avaliação de qualidade com base no conteúdo de aminas biogênicas</i>	105
4.5.5	<i>Ensaio colorimétricos para determinação de histamina.....</i>	108
4.6	Conclusões	113
5	CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE ALDEÍDOS VOLÁTEIS DE AMOSTRAS DE CAFÉ POR MICROEXTRAÇÃO POR DIFUSÃO GASOSA (GDME) E SALLE	114
5.1	Introdução	114
5.2	Revisão Bibliográfica	116
5.2.1	<i>Acetaldeído, formaldeído e 2-furfural em alimentos</i>	118
5.2.2	<i>Efeitos de acetaldeído, formaldeído e 2-furfural na saúde humana</i>	121
5.2.3	<i>Limites regulatórios para aldeídos em alimentos.....</i>	123
5.2.4	<i>Métodos empregados para a análise de aldeídos</i>	123

5.2.5	<i>Técnicas de tratamento de amostras para análise de aldeídos.....</i>	<i>126</i>
5.2.5.1	<i>Microextração por difusão gasosa (GDME).....</i>	<i>127</i>
5.3	Objetivos	131
5.4	Parte Experimental	131
5.4.1	<i>Reagentes e amostras</i>	<i>132</i>
5.4.2	<i>Preparação do reagente de derivatização</i>	<i>132</i>
5.4.3	<i>Microextração por gás difusão (GDME)</i>	<i>132</i>
5.4.4	<i>Extração líquido-líquido assistida por salting-out (SALLE)</i>	<i>133</i>
5.4.5	<i>Condições Cromatográficas</i>	<i>134</i>
5.4.6	<i>Verificação das melhores condições de extração.....</i>	<i>134</i>
5.4.7	<i>Otimização das condições de GDME</i>	<i>135</i>
5.4.8	<i>Otimização das condições de SALLE.....</i>	<i>136</i>
5.4.9	<i>Avaliação dos parâmetros analíticos</i>	<i>136</i>
5.5	Resultados e discussão.....	137
5.5.1	<i>Verificação das melhores condições de extração.....</i>	<i>138</i>
5.5.2	<i>Otimização das condições de SALLE.....</i>	<i>141</i>
5.5.3	<i>Otimização da técnica GDME.....</i>	<i>143</i>
5.5.4	<i>Performance analítica do método proposto.....</i>	<i>146</i>
5.5.5	<i>Análise de amostras de café pelo método proposto.....</i>	<i>150</i>
5.6	Conclusões	152
6	CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ANALÍTICO POR POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO (MIP) ACOPLADO À SALLE PARA DETERMINAÇÃO DE 5-(HIDROXIMETIL)-2-FURFURAL EM AMOSTRAS DE CAFÉ	153
6.1	Introdução	153
6.2	Revisão Bibliográfica	155
6.2.1	<i>HMF em alimentos</i>	<i>156</i>
6.2.2	<i>HMF na saúde e legislação nos alimentos</i>	<i>160</i>

6.2.3	<i>Métodos analíticos para determinação de HMF em alimentos</i>	163
6.2.4	<i>Sensores eletroquímicos</i>	167
6.2.4.1	<i>Sensores voltamétricos</i>	167
6.2.4.2	<i>Eletrodos quimicamente modificados</i>	169
6.2.4.2.1	<i>Polímeros Molecularmente Impressos</i>	170
6.3	Objetivos	175
6.4	Parte Experimental	175
6.4.1	<i>Reagentes e amostras</i>	175
6.4.2	<i>Equipamento</i>	176
6.4.3	<i>Preparação do MIP na superfície do eletrodo</i>	176
6.4.4	<i>Procedimento de SALLE para extração de HMF</i>	177
6.4.5	<i>Caracterização do MIP de p-ABA</i>	178
6.4.6	<i>Avaliação dos parâmetros analíticos do método proposto</i>	178
6.5	Resultados e Discussão	179
6.5.1	<i>Avaliação eletroquímica</i>	179
6.5.2	<i>Otimização dos parâmetros para preparação do MIP</i>	184
6.5.3	<i>Otimização da técnica de SALLE</i>	189
6.5.4	<i>Avaliação dos parâmetros analíticos do método</i>	191
6.5.5	<i>Determinação de HMF em amostras de café</i>	198
6.6	Conclusões	199
7	CONCLUSÕES GERAIS	200
	REFERÊNCIAS	202

1 INTRODUÇÃO

O conceito de qualidade alimentar depende do referencial adotado para caracterizá-la. Um alimento pode ser bom em relação a uma característica e ruim em relação a outra, por exemplo, existem alimentos que são considerados saborosos, mas não são nutritivos. A percepção da qualidade depende do critério utilizado para defini-la e esse critério pode ser subjetivo ou objetivo (GRUNERT, 2005). Os consumidores tendem a adotar critérios subjetivos para determinar a qualidade dos alimentos, verificando seus aspectos visuais e odoríferos, informações nutricionais e seus benefícios à saúde. Existe também a predileção dos consumidores por alimentos de origem orgânica, por aqueles produzidos a partir de animais criados em condições de baixo estresse e que não utilizam organismos geneticamente modificados. A indústria alimentar, por outro lado, leva em consideração critérios objetivos para determinar a qualidade do alimento, que estão relacionados, principalmente, aos aspectos sanitários, e para garanti-los são implantadas ferramentas de controle de qualidade. Entre elas, as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Processo (APPCP) buscam a implementação de práticas higiênicas necessárias para garantir a qualidade sanitária dos alimentos, minimizar os riscos de contaminação e encontrar pontos na etapa de produção onde medidas preventivas devem ser adotadas para evitar riscos à saúde do consumidor. O *Codex Alimentarius*, e a ISO 22000 garantem a normalização dos critérios de qualidade e visam assegurar práticas igualitárias no comércio de alimentos e proteger a saúde do consumidor (MARINS; TANCREDI; GEMAL, 2014).

A história da qualidade alimentar é quase tão antiga quanto a própria história da humanidade. A primeira necessidade do homem pré-histórico foi se alimentar e por isso procurou meios para prolongar a vida útil dos alimentos e garantir sua qualidade. As primeiras civilizações, provavelmente por tentativa e erro, começaram a desenvolver as formas básicas de preservação dos alimentos, sendo o sal o primeiro composto adicionado aos alimentos com a finalidade de preservá-los (GRIFFITH, 2006). A fermentação, que também prolonga a vida útil dos alimentos, era um procedimento adotado por diversas civilizações antigas, que já fabricavam vinhos, cervejas e queijos (GRIFFITH, 2006). Com a Revolução Industrial, os avanços tecnológicos proporcionaram uma maior capacidade de produzir, preservar e distribuir alimentos em larga escala. Em 1810, Nicolas Appert, um confeitoiro

francês que procurava resolver questões práticas do dia-a-dia, começou a usar garrafas de champagne vedadas e submetidas a água fervente num banho maria para armazenar alimentos. Seu processo de preservação de alimentos ajudou a abastecer o exército e marinha franceses e deu origem as conservas de alimentos (STANDAGE, 2010). Em 1857, Louis Pasteur demonstrou os fundamentos teóricos das descobertas de Appert, comprovando que a ação destruidora do calor sobre os microrganismos presentes nos alimentos perdurava por mais tempo quando eles eram submetidos a elevadas temperaturas em recipientes hermeticamente fechados (STANDAGE, 2010). O conceito de segurança alimentar surgiu com o final da Primeira Guerra Mundial, após o mundo ter vivenciado um cenário de escassez de alimentos, e é pautado em três pilares: garantir a disponibilidade dos alimentos, garantir o acesso da população à alimentação e garantir a qualidade sanitária, biológica e nutricional dos alimentos (NASCIMENTO; ANDRADE, 2010). Em 1948, a Organização Mundial de Saúde criou um fórum internacional para normalização de alimentos, o *Codex Alimentarius*, com um conjunto de normas alimentares de caráter internacional criado com o objetivo de proteger a saúde do consumidor e equiparar práticas de comércio de alimentos, referente à sua produção, elaboração e distribuição, que contém disposições relativas à higiene, rotulagem, resíduos de pesticidas, medicamentos veterinários, sistemas de controle e certificação de importações e exportações, métodos de análise e amostragem, aditivos, contaminantes e embalagens (ORTEGA; BORGES, 2015). Em 1970, experimentos desenvolvidos pela NASA que visavam encontrar maneiras de prolongar a vida útil dos alimentos e garantir sua segurança para que pudessem ser consumidos durante viagens espaciais, levaram a elaboração da APPCP, que hoje serve como base para a indústria alimentar (WEINROTH; BELK; BELK, 2018). Por fim, em 2005, foi criada a ISO 22000, um sistema de gestão de qualidade específico para garantir a segurança de alimentos em todas as etapas da cadeia de abastecimento e produção dos alimentos.

Mesmo com todas as normas de qualidade adotadas, ainda se tem no mundo um cenário onde anualmente são registrados 600 milhões de casos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA), com 420 mil óbitos (WHO, 2020). No Brasil, entre os anos de 2012 e 2021, foram reportados 6 347 casos e 89 óbitos (BRASIL, 2022). Essas doenças são causadas, principalmente, por falhas no processo de produção que acarretam em riscos biológicos, físicos e químicos. Os riscos biológicos são os

de maior relevância para a saúde pública, por serem os mais graves, são causados pela ingestão de alimentos contaminados por fungos, bactérias, parasitas e vírus devido a condições higiênicas precárias durante alguma etapa da cadeia de produção do alimento, entre eles destacam-se as doenças causadas por *Salmonella sp.* e *Escherichia coli* (WHO, 2015). Os riscos físicos estão relacionados a elementos como ossos, sementes, insetos, vidro, metal e pelos, que são resultantes das matérias-primas utilizadas e materiais presentes em todas as etapas da cadeia de produção e distribuição do alimento, que quando não controlados de maneira correta podem representar uma ameaça à saúde (BERTI; SANTOS, 2016). Os riscos químicos podem contaminar o alimento em diversos pontos da cadeia alimentar, desde o processamento, preparação, armazenamento e manuseio do alimento, abrangem os pesticidas, produtos utilizados na produção dos alimentos, medicamentos, alergênicos, substâncias produzidas durante a preparação ou cozimento, entre outros (LINEBACK; STADLER, 2009). Entre alguns exemplos de riscos químicos, acrilamida (formada em alimentos processados à altas temperaturas) e tropomiosina (encontrada no camarão) são vastamente reportados na literatura por seus potenciais carcinogênicos e alergênicos, respectivamente. A tropomiosina também possui o efeito de liberar histamina quando em contato com as células. A histamina, é um exemplo de amina biogênica e a mais associada, entre elas, com incidentes de intoxicação alimentar. Essa amina é encontrada, principalmente, em peixes como atum, anchova, sardinha e cavalinha (SARKADI, 2009).

O café é umas das *commodities* mais comercializadas no mundo e o Brasil é o maior produtor e exportador de café, contribuindo com mais de 30 % da produção e exportação mundial (EMPRABA, 2021). São vários os fatores que determinam a qualidade do produto final, envolvendo desde a pré-colheita até o armazenamento do café, que irão influenciar nas características microbiológicas, físicas e químicas, além das características sensoriais e de segurança. O mercado de café tem buscado alternativas adequadas para classificação da qualidade da bebida que sejam aceitas e adotadas por todos os segmentos da cadeia produtiva desse produto buscando minimizar aspectos subjetivos de técnicas de classificação tradicionais (PIMENTA; ANGÉLICO; CHALFOUN, 2018).

Este trabalho está dividido em três partes, onde são abordados compostos, especificamente aminas e aldeídos, frequentemente encontrados em diferentes tipos

de alimentos e que podem ser utilizados para avaliar características relacionadas à aspectos da qualidade alimentar. As aminas biogênicas, além da implicação de efeitos adversos à saúde humana, podem aumentar nos alimentos conforme ocorre degradação. A concentração das aminas biogênicas pode ser, portanto, um indicador das condições de higiene desde a produção, distribuição e comercialização final. O 5-hidroximetilfurfural (HMF) é um dos principais produtos formados no processamento de alimentos submetidos a tratamento térmico e o café é a principal fonte de exposição humana a ele. Muitos aldeídos também fazem parte da composição da fração volátil do café e auxiliam na caracterização desse produto, fornecendo informações a respeito das etapas empregadas na sua produção e armazenamento.

Uma vez que alimentos são matrizes complexas e com muitos interferentes, a determinação desses compostos, que estão presentes em concentrações muito baixas, constituem um desafio para a análise de alimentos. Para que as análises sejam possíveis, uma etapa de preparo de amostra é essencial e deve permitir análises seletivas e reprodutíveis. O preparo de amostras impacta todas as etapas posteriores da análise, portanto é fundamental para garantir a identificação e quantificação adequadas dos analitos. O uso da técnica de extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE, do inglês *Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction*) pode ser uma alternativa para a separação de componentes traços de interesse presentes em matrizes alimentares. Na primeira parte desse trabalho, aminas biogênicas foram extraídas de amostras de peixes e carnes em uma etapa realizada simultaneamente com a derivatização. Na segunda parte, a SALLE foi acoplada ao desenvolvimento de um polímero molecularmente impresso (MIP) para determinação de HMF em amostras de café. Na terceira parte, micro extração por difusão gasosa (GDME) foi utilizada para extração de aldeídos voláteis (formaldeído, acetaldeído e 2-furfural) em amostras de café, seguida de uma etapa de SALLE, que promoveu um enriquecimento da extração dos analitos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Apesar do contínuo avanço no desenvolvimento de instrumentos analíticos, a preparação de amostras ainda é um passo crítico para a determinação de analitos em diversos tipos de alimentos. A análise de matrizes alimentares representa um

desafio analítico, por serem uma matriz complexa e muitas vezes estarem no estado sólido. Em condições em que componentes químicos estão presentes em concentrações muito baixas, mesmo uma pouca quantidade de outros compostos pode interferir na análise de interesse. Quando os compostos a serem analisados estão presentes em baixas concentrações os interferentes crescem com o inverso da concentração. A análise dessas amostras é difícil ou mesmo impossível sem que seja realizado um tratamento adequado. Por isso, o preparo da amostra é um aspecto crucial de qualquer procedimento analítico na determinação de componentes traço em matrizes alimentares (KHATIBI; HAMIDI; SIAHI-SHADBAD, 2020). O principal objetivo do preparo de amostras é extrair o analito de interesse de uma amostra de matriz complexa e promover alterações químicas que possam ser necessárias para sua determinação pela técnica analítica utilizada.

Com os avanços da química analítica, o preparo de amostras gradualmente se tornou uma parte majoritária das análises e considera-se que corresponde a quase 80 % do procedimento analítico, que inclui, amostragem, preparo de amostra, separação, detecção e análise de dados. A demanda crescente em análises de matrizes alimentares e ambientais impulsionou o desenvolvimento de novas tecnologias para o preparo de amostras, buscando técnicas que possibilitem determinações sensíveis, seletivas, reprodutíveis e ambientalmente amigáveis (CHEN *et al.*, 2008). A técnica SALLE é uma proposta para preparo de amostras que atende muitos dos requisitos desejáveis para essa finalidade.

No desenvolvimento de métodos analíticos é fundamental que seja realizada a validação de parâmetros analíticos do método proposto. Através de estudos experimentais, a validação garante que o método atende as exigências das aplicações analíticas e assegura que os resultados fornecidos são confiáveis. Portanto, pela verificação dos resultados dos parâmetros analisados pode-se afirmar se o procedimento experimental proposto está apto ou não para ser aplicado a análise de amostras reais.

2.1 Técnicas de preparo de amostras

O preparo de amostras consiste no isolamento e concentração do analito de interesse de algumas matrizes. Para que análises sejam realizadas é promovida uma transformação da amostra real para uma amostra compatível com uma técnica

de análise ou com o detector que serão utilizados. Dessa forma, ocorre a remoção de compostos que possam interferir na identificação ou quantificação dos analitos de interesse. Busca-se também chegar em uma concentração dos analitos em níveis que permitam sua quantificação, além de incluir algumas vezes a modificação química do analito para possibilitar sua detecção pela técnica utilizada. Algumas características desejáveis na técnica empregada para o preparo da amostra são a máxima recuperação do analito de interesse, menor número de etapas possíveis, alta precisão, rapidez, possibilidade de automatização, pouco uso de solventes orgânicos e baixa geração de resíduos. O preparo de amostra pode impactar todos os estágios posteriores da análise e, portanto, é uma etapa crítica para garantir a correta identificação e quantificação dos analitos (CHEN *et al.*, 2008).

Alguns processos físico-químicos de separação que podem ser citados são partição, adsorção, volatilização, filtração, afinidade e troca iônica. Além deles, métodos como moagem e peneiramento podem ser utilizados para separar partículas por tamanho. Já métodos que utilizam a gravidade, como centrifugação e sedimentação são usados para isolar amostras heterogêneas e fases líquidas em extrações líquido-líquido. Na partição, os analitos são removidos da amostra por dissolução em solvente apropriado. Na adsorção os analitos ficam retidos na superfície de um sólido com elevado poder adsorptivo. Na separação por troca iônica, as interações entre moléculas do analito com cargas opostas governam a separação. Na volatilização, os analitos separam-se da matriz e dos interferentes no processo de mudança de fase, para serem posteriormente recolhidos em um solvente compatível com eles. A filtração utiliza membranas para a separação de partículas, que nesse processo é governada pelas diferenças de tamanho dos constituintes da solução e pela porosidade da membrana (CHEN *et al.*, 2008).

Extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) é uma das técnicas mais comuns de preparo de amostras e, provavelmente, uma das mais antigas utilizadas para a determinação de diversos componentes químicos em diferentes matrizes de alimentos (KHATIBI; HAMIDI; SIAHI-SHADBAD, 2020). Na LLE, o analito é transferido de uma amostra aquosa para um solvente imiscível em água. A diferença de solubilidade entre as duas fases afeta sua extração do analito e a transferência da primeira fase líquida para a segunda. Essa transferência confere à técnica melhor seletividade do que métodos simples de extração com solvente. Apesar do vasto uso e boa performance analítica da LLE, ela apresenta algumas

desvantagens, como a formação de emulsões, perda de analito, contaminação da amostra, baixa sensibilidade, dificuldade de automação, necessidade de grandes volumes de amostra e de solventes orgânicos. Por conta dessas características, hoje em dia, LLE é considerada uma técnica cara, demorada, trabalhosa, perdulária e ambientalmente não amigável, sendo contrária aos princípios da Química Verde (KHATIBI; HAMIDI; SIAHI-SHADBAD, 2020).

A busca atual pela redução no consumo de solventes orgânicos impulsionou o desenvolvimento de técnicas miniaturizadas no tratamento de amostras. A vantagem associada ao processo é a redução do tempo das extrações, além do procedimento ser considerado em conformidade com os princípios da Química Verde. Estas características resultaram na última década em uma evolução substancial das técnicas baseadas em LLE (KHATIBI; HAMIDI; SIAHI-SHADBAD, 2020). Diferentes variações das técnicas miniaturizadas, como microextração em fase líquida (LPME, do inglês *Liquid Phase Microextraction*), extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE, do inglês *Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction*), microextração com fibra porosa (HF-LPME, do inglês *Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction*), microextração por gota única (SDME, do inglês *Single Droplet Microextraction*) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) têm sido utilizadas para extração de analitos de matrizes complexas. As técnicas miniaturizadas também apresentam como vantagens alta eficiência, baixo custo, agilidade e favorecem a seletividade das análises (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

Em comparação com a LLE, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) tem como principal vantagem o menor uso de solventes orgânicos e uma grande variedade de materiais que podem ser utilizados como sorventes. Esses materiais consistem em trocadores aniônicos ou catiônicos ou grupos funcionais apolares, como octadecilsilano (C18). Entretanto, é um método demorado, requer o uso de solventes orgânicos para a eluição dos analitos e pode ser considerado de alto custo se for automatizado (KHATIBI; HAMIDI; SIAHI-SHADBAD, 2020; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

Microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*) é uma técnica de preparo de amostra simples e que faz uso de poucas quantidades de solvente. Em comparação com técnicas clássicas, importantes melhorias foram feitas com essa técnica. Entretanto, SPME é uma técnica demorada e em alguns

casos pode ser observado um efeito de contaminação por outros analitos. Além disso, muitas dos materiais utilizados nessa técnica são frágeis, caros, tem um tempo de uso limitado e possuem efeitos de memória (KHATIBI; HAMIDI; SIAHI-SHADBAD, 2020, SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

A fim de superar as desvantagens listadas para o SPME, foi desenvolvida a microextração líquido-líquido (LPME, do inglês *Liquid Phase Microextraction*). Ao mesmo tempo, a LPME também foi utilizada para resolver problemas da LLE. Comparada à LLE convencional, a LPME é mais rápida, mais barata, mais simples de executar, ambientalmente amigável, tem maior eficiência, utiliza uma quantidade mínima de solventes orgânicos, e pode ser automatizada. Apenas alguns microlitros (μL) de solventes orgânicos são requeridos para a LPME, enquanto a LLE consome centenas de mililitros (mL). Geralmente, uma quantidade de poucos mL de um solvente orgânico imiscível em água é utilizada como fase extratora (fase aceptora) para uma amostra aquosa (fase doadora) que contém o analito alvo. Devido à grande razão entre o volume da amostra e o volume do solvente de extração, maiores enriquecimentos do analito podem ser obtidos por essa técnica (KHATIBI; HAMIDI; SIAHI-SHADBAD, 2020). Além disso, LPME é adaptável à diversos tipos de instrumentos analíticos, como eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e cromatografia gasosa, sendo possível realizar a injeção do extrato diretamente nos equipamentos cromatográficos (MOHAMMED *et al.*, 2016). Essa técnica tem demonstrado ser uma promissora ferramenta para a pré-concentração de analitos traços em amostras complexas, devido as vantagens listadas anteriormente, à facilidade da extração e aos baixos limites de detecção que podem ser alcançados. Entretanto, o uso da LPME na análise de amostras de alimentos pode ser problemático devido à complexidade dessas amostras. Portanto, métodos preliminares de extração ou *clean-up* (isolamento), seguidos pela reconstituição do analito em um solvente adequado, são necessários para realizar a LPME, especialmente em amostras de alimentos sólidos (KHATIBI; HAMIDI; SIAHI-SHADBAD, 2020).

Na microextração por gota única (SDME, do inglês *Single Droplet Microextraction*), um pequeno volume de um solvente orgânico imiscível com a água é imerso em uma amostra líquida ou exposto em um *headspace*. A fase orgânica é coletada por uma seringa. É um método simples, barato e pode ser facilmente

automatizado. Além disso, é possível realizar repetidas extrações de uma mesma amostra usando apenas uma seringa. Entretanto, o uso do solvente de extração em pequenos volumes resulta em uma pequena área de contato entre as fases doadora e aceptora, o que aumenta o tempo de extração. A solubilidade parcial do solvente em água e a possibilidade de desprendimento da gota na ponta da agulha durante a extração também são desvantagens da SDME (SPIETELUN *et al.*, 2014).

Na microextração com fibra porosa (HF-LPME, do inglês *Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction*), uma fibra porosa contendo um solvente orgânico é utilizada para o procedimento de extração. Os analitos de interesse são extraídos da amostra aquosa para o solvente extrator imobilizado nas cavidades porosas e dissolvidos na solução aceptora dentro do tubo utilizado. Esse método é simples, barato e fornece um alto fator de enriquecimento em relação ao analito em um curto período de tempo, além de utilizar pequenas quantidades de solventes orgânicos. A fibra tem baixo custo e pode ser descartada após o uso, evitando problemas de memória e contaminação. Outra vantagem é que a amostra extraída pode ser introduzida diretamente no sistema de análise. Desvantagens estão relacionadas à precisão e à necessidade de períodos maiores de extração em comparação com outras técnicas (SPIETELUN *et al.*, 2014).

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) é uma técnica fácil de executar, barata, apresenta altas taxas de recuperação e enriquecimento e utiliza poucas quantidades de solventes orgânicos. O mecanismo dessa técnica é baseado na formação de um sistema de solvente ternário, que consiste em um solvente de extração imiscível em água, um solvente de dispersão miscível em água e uma solução aquosa contendo o analito. Primeiramente, o solvente de extração é misturado com o solvente de dispersão e ambos são rapidamente introduzidos na solução da amostra, com isso é formada uma solução turva formada por finas gotículas do solvente de extração dispersas na amostra aquosa. A DLLME é feita em poucas etapas, o que minimiza a perda de analitos e erros analíticos, e a extração ocorre quase que instantaneamente. Devido à alta superfície de contato com a amostra e às numerosas gotículas do solvente de extração, o equilíbrio entre a amostra e o solvente é rapidamente alcançado. Quando a mistura é centrifugada são formadas duas fases e o solvente de extração pode ser facilmente coletado para análise. O solvente dispersivo empregado deve ser miscível com o solvente de extração e com

a solução da amostra. Já o solvente de extração deve ser imiscível com a água, apresentar alta capacidade de extração, ter alta afinidade com o analito, ter densidade diferente da fase aquosa e ser compatível com o reagente de derivatização e com os produtos derivatizados (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

2.1.1 Extração líquido-líquido assistida por salting-out (SALLE)

Outra técnica baseada na LLE desenvolvida recentemente é a extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE, do inglês *Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction*). Em meio à diferentes técnicas de separação, a aplicação da técnica de SALLE tem sido adotada nas extrações para modificar os limites de miscibilidade, aumentar o coeficiente de distribuição, promover a precipitação de proteínas em sistemas biológicos e melhorar as recuperações em sistemas líquido-líquido (KUMARI; VUPPALA; SATYAVATHI, 2020; VALENTE; GONÇALVES; RODRIGUES, 2013). A SALLE oferece vantagens como baixo custo, rápida formação de fases, aumento na separação dos componentes menos solúveis em água e, conseqüentemente, amplia as possibilidades de escala experimental aplicada. Além, disso, SALLE é ambientalmente amigável e foi considerada uma técnica de alto rendimento em relação aos métodos já conhecidos (KUMARI; VUPPALA; SATYAVATHI, 2020).

Essa técnica consiste em uma mistura de dois líquidos de miscibilidades semelhantes, geralmente água e um solvente orgânico parcialmente miscível em água, e um eletrólito (sal). O eletrólito é adicionado a mistura de líquidos com a finalidade de reduzir a miscibilidade entre os dois líquidos e promover a formação de um sistema de duas fases. O mais polar entre os dois solventes vai preferencialmente solvatar o eletrólito, deixando o analito de interesse (menos polar) disponível para ser transferido para a fase orgânica. Após a centrifugação da mistura, a fase orgânica contendo os analitos de interesse pode ser coletada (FU *et al.*, 2021). A Figura 1 ilustra o procedimento de SALLE.

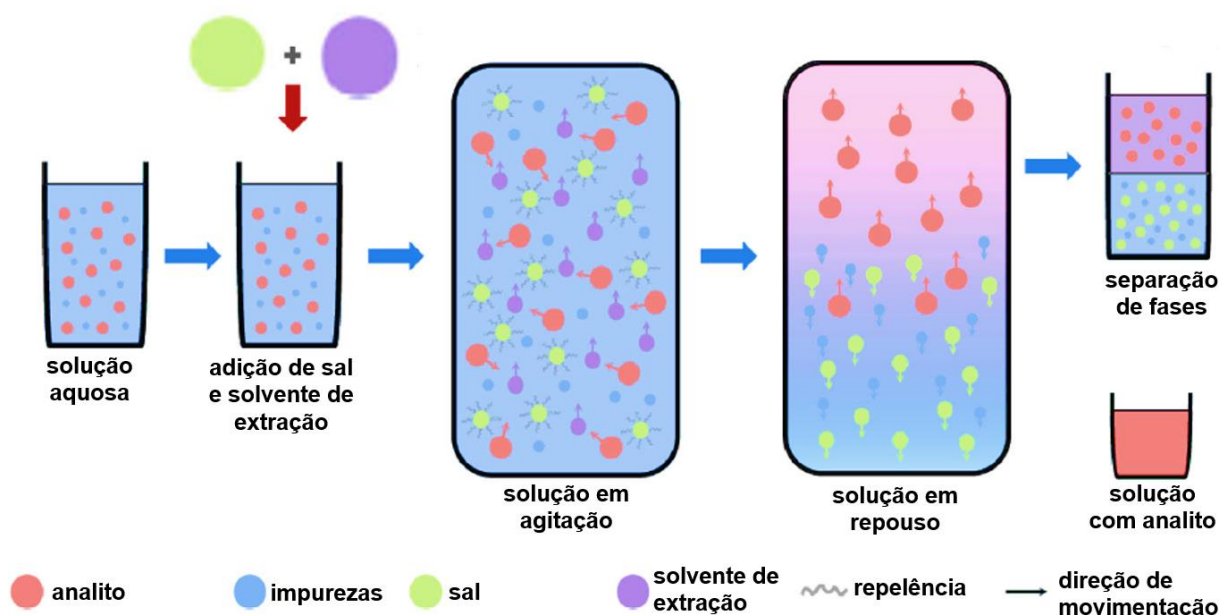


Figura 1 – Representação esquemática do procedimento de SALLE

Fonte: adaptada de FU *et al.* (2021).

Considerando como eletrólito um sal de alta solubilidade em água e como não-eletrólito uma substância de baixa solubilidade, também na água. O efeito *salting* é resultado da adição de um sal eletrolítico à uma solução aquosa, promovendo alteração na solubilidade do não-eletrólito. Pode haver tanto um aumento quanto uma diminuição na solubilidade do não-eletrólito com o aumento da concentração do eletrólito adicionado. Esses efeitos são conhecidos como *salting-out* e *salting-in*, respectivamente (GROVER; RYALL, 2005).

O efeito *salting-out* inclui a adição de um sal cosmotrópico, ou seja, que contribui para a estabilidade e estrutura das interações água-água para uma mistura composta por solução aquosa e solvente orgânico miscível em água. Quando a concentração de sal excede o limite de solubilidade, o resultado é a separação de fase induzida por sal, ou seja, a fase aquosa fica enriquecida com o sal e a fase orgânica fica enriquecida com os componentes menos polares que se desejava separar (KUMARI; VUPPALA; SATYAVATHI, 2020).

A quantidade de eletrólito adicionada é diretamente proporcional à quantidade de não-eletrólito precipitada. O valor da constante dos sais, k , é igual aos produtos dos componentes catiônicos e aniônicos do sal e, foi demonstrado, que a constante k é fortemente dependente do eletrólito e depende em menor extensão do não-eletrólito. Diferentes cátions e ânions fornecem diferentes constantes de sais iônicos e, portanto, diferentes combinações influenciam no potencial do sal em causar o

efeito *salting-out*. Essas diferenças podem ser atribuídas ao tamanho, estrutura, carga, hidratação e polarizabilidade dos sais. A eficiência de alguns cátions comuns como agentes *salting-out* decresce na ordem de $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+ > \text{Ba}^{+2} > \text{Rb}^+ > \text{Ca}^{+2} > \text{Ni}^{+2} > \text{Co}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Fe}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Cs}^+ > \text{Mn}^{3+} > \text{Al}^{3+} > \text{NH}_4^+ > \text{H}^+$. Para os ânions, a sequência decrescente é $\text{OH}^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{CO}_3^{2-} > \text{ClO}^- > \text{BrO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{IO}_3^- > \text{NO}_3^-$ (GROVER; RYALL, 2005).

O sal escolhido para promover o efeito *salting-out* deve ter elevada solubilidade em água, baixa solubilidade ou ser insolúvel em solvente orgânico e ser adequado para induzir a precipitação de moléculas hidrofílicas. Muitos sais orgânicos e inorgânicos podem promover o efeito *salting-out* e aumentar a transferência dos analitos hidrofílicos para o solvente orgânico, entre eles cloreto de sódio (NaCl), sulfato de magnésio (MgSO_4), acetato de sódio (CH_3COONa), acetato de amônio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) e sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) são alguns dos mais utilizados (KHATIBI; HAMIDI; SIAHI-SHADBAD, 2020).

Acetonitrila é um dos solventes mais comumente utilizados na SALLE por ser quimicamente inerte com analitos orgânicos, ter capacidade de precipitar proteínas e devido à sua vasta utilização como fase móvel em cromatografia líquida. Outros solventes que também são frequentemente utilizados para separação em SALLE são acetona, etanol, tetrahidrofurano, metanol, propanol, pentanol e acetato de etila. A eficiência de extração de compostos polares pode ser aumentada utilizando solventes polares (KHATIBI; HAMIDI; SIAHI-SHADBAD, 2020).

O efeito da adição de sais às soluções com não eletrólitos depende também de um grande número de interações intermoleculares que ocorrem entre o íon e o solvente, o íon e o não-eletrólito e o não-eletrólito e o solvente. A extensão dessas interações varia de acordo com os tipos de íons, solventes e não-eletrólitos envolvidos. Grover e Ryall (2005) estudaram os mecanismos de efeito do *salting-out* que são baseados no comportamento dos constituintes do sistema.

A teoria de hidratação é a mais antiga e simples explicação para o efeito *salting-out*. Ela postula que os íons em solução atraem as moléculas do solvente e, conseqüentemente, são cercados por uma camada dessas moléculas. Quando um eletrólito é adicionado a uma solução de não-eletrólito, eles competem pelas moléculas de solvente. As moléculas do solvente têm maior afinidade pelos eletrólitos e se afastam das moléculas do não-eletrólito. Assim, diminui a hidratação e solubilidade das moléculas do não-eletrólito, que, como consequência, precipitam ou

podem ser transferidas para outra fase com a qual tenham mais afinidade (KUMARI; VUPPALA; SATYAVATHI, 2020).

Geralmente cátions têm um grau de hidratação maior do que ânions. Porém o efeito de *salting-out* de um eletrólito depende do balanço das cargas opostas. Quando o solvente é a água a natureza das interações íon-solvente são complexas. Interações hidrofóbicas, hidrofílicas, de quebra de estrutura e de polarização entre íons e solvente geralmente coexistem, porém a extensão dessas interações varia de acordo com o íon e o solvente. A principal desvantagem das teorias de hidratação é que ela implica que cada íon atrai uma quantidade finita de moléculas de água e não tem efeito nas moléculas restantes de solvente. Também implica que as moléculas de não-eletrólitos não influenciam na hidratação, o que não é verdadeiro. Além disso, as teorias de hidratação não explicam o efeito *salting-in* (GROVER; RYALL, 2005).

Outra teoria para explicar o *salting-out* considera que as variações de efeitos de sais específicos em não-eletrólitos ocorrem devido aos dipolos de água na camada de hidratação em torno do íon serem orientados. Dessa forma, se houver uma orientação preferencial das moléculas de água em direção a um soluto polar, os íons de mesmo sinal devem ter uma tendência a promover sua solubilidade (*salting-in*), enquanto os íons de carga oposta, que devem orientar as moléculas de água desfavoravelmente, têm uma tendência de diminuir sua solubilidade (*salting-out*). Embora o modelo do dipolo seja útil para interpretar os resultados do efeito *salting-out* observados para diferentes solutos polares, ele não explica as variações observadas nos efeitos de diferentes solutos não-polares (GROVER; RYALL, 2005).

A teoria eletrostática postula que a quantidade de trabalho necessária para descarregar os íons no solvente puro são diferentes daquelas exigidas em uma solução que contém o soluto. Elas relacionam tanto o *salting-out* como o *salting-in* para a influência do soluto na constante dielétrica do solvente. Dessa forma, se a solução saturada de soluto tem uma constante dielétrica menor do que a água ocorre o *salting-out*, e se a solução saturada de soluto tem uma constante dielétrica maior do que a água, ocorre o *salting-in* (GROVER; RYALL, 2005).

Outro modelo para explicar os efeitos *salting-out* e *salting-in* propõe que a presença de soluto exerce uma pressão interna nas moléculas do solvente, que, por sua vez, modifica as interações entre íon e solvente e causa a precipitação dos não-eletrólitos. Essa teoria considera que a extensão do efeito *salting-out* ou *salting-in* de

um soluto não-polar é determinado pela extensão com que o solvente é comprimido ou expandido quando o íon está presente. Geralmente, quando a compressibilidade das soluções aumenta, o efeito *salting-out* diminui, e vice-versa. Essa teoria, entretanto, funciona apenas para avaliação de não-eletrólitos não-polares, e não explica comportamento de não-eletrólitos polares (GROVER; RYALL, 2005).

Outra teoria considera as forças de Van der Waals, que tem como princípio as interações eletrostáticas de curto alcance que ocorrem entre íons e moléculas neutras. Essas interações intermoleculares podem ser atrativas ou dispersivas. As forças dispersivas foram sugeridas com um apreciável papel no efeito de *salting* dos íons (GROVER; RYALL, 2005).

SALLE tem uma ampla gama de aplicações no que diz respeito a natureza dos analitos e às técnicas instrumentais as quais os extratos podem ser submetidos para análise (JAIN; GUPTA; VERMA, 2015). No Quadro 1 é apresentada uma revisão sobre os trabalhos que utilizaram SALLE nos últimos anos, contendo as amostras que foram utilizadas, os analitos extraídos, os solventes de extração e respectivos volumes utilizados e os tipos de sais utilizados para promover o efeito *salting-out* e suas quantidades.

Matkovich e Christian (1973) foram os primeiros a propor separações com SALLE. Eles testaram 79 sais como possíveis agentes *salting-out* para promover a extração de metais quelatos de água utilizando acetona como solvente de extração e obtendo uma melhora na recuperação pela inclusão de CaCl_2 na água (KUMARI; VUPPALA; SATYAVATHI, 2020).

Leggett, Jenkins e Myares (1990) mostraram a eficiência de utilizar acetonitrila e NaCl para promover a extração de compostos orgânicos em comparação com cloreto de metileno como solvente de extração. Porém, para as extrações realizadas nesse trabalho, foram utilizados 100 mL de acetonitrila e 130 g de NaCl, quantidades consideradas muito altas para serem utilizadas atualmente e que não estariam em conformidade com a Química Verde, pois os avanços das técnicas de separação permitiram trabalhar com massas e volumes menores. Anastassiades *et al.* (2003) realizaram a extração por *salting-out* utilizando o NaCl como sal promovedor do *salting-out* em conjugação com MgSO_4 . O MgSO_4 é um agente de secagem e foi adicionado com o intuito de retirar a água e forçar os analitos (no caso do trabalho citado, pesticidas) para a fase orgânica (no caso do trabalho citado, acetonitrila) (KUMARI; VUPPALA; SATYAVATHI, 2020).

O efeito *salting-out* tem sido utilizado para a recuperação de explosivos de nitro aromáticos e nitraminas de águas naturais com concentração de nanogramas por litro pelo método da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*). De acordo com o relatório, carbonato de potássio, sulfato de amônio e citrato de sódio desidratado foram observados como melhores agentes promotores do efeito *salting-out* (KUMARI; VUPPALA; SATYAVATHI, 2020).

Diferentes sais foram avaliados para promover a extração de compostos α -dicarbonílicos de cerveja com acetonitrila e determinação por HPLC-UV e NaCl foi o sal que mais influenciou nos resultados (VALENTE; GONÇALVES; RODRIGUES, 2013). SALLE foi usada junto com DLLME para extração de glioxal e metilglioxal de amostras de urina com detecção por GC-MS (PASTOR-BELDA *et al.*, 2017). Chen *et al.* (2019b) utilizaram SALLE para extrair 5-hidroximetilfurfural (HMF) de amostras de mel com 0,5 g de NaCl e acetonitrila e determinação por HPLC-UV e obteve recuperação de 95 %. SALLE também foi usada junto com microextração líquido-líquido assistida por vórtex para potencializar a extração de furfurais em amostras de fruta. Na microextração líquido-líquido assistida por vórtex a dispersão acontece pela agitação do vórtex, que causa uma leve emulsificação da solução e dispensa, portanto, o uso de um solvente de dispersão. As gotículas finas formadas podem extrair os analitos mais rapidamente devido a uma menor distância de difusão e maior área de superfície exposta. Taxas de recuperação de 80 % foram consideradas satisfatórias e alcançadas utilizando 1-hexanal como solvente de extração e NaCl para promover o efeito *salting-out* (ABU-BAKAR; MAKAHLEH; SAAD, 2014).

Quadro 1 – Revisão da literatura de trabalhos que utilizaram SALLE para preparo de amostra

solvente de extração (mL)	sal (g)	técnica de análise	analito	amostra	referência
acetonitrila (3)	NaCl (0,1)	CE	inibidores de tirosina quinase	plasma humano	(AHMED <i>et al.</i> , 2018)
acetonitrila (0,15)	NaCl (0,005)	CE	inibidores de tirosina quinase	plasma humano	(AHMED <i>et al.</i> , 2020)
acetonitrila (1)	NaCl (4)	HPLC-UV	anfetamina e metanfetamina	urina	(AKRAMIPOUR <i>et al.</i> , 2016)
tolueno (1)	NaCl (1,16)	GC-MS	topiramato	soluções aquosas	(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2020)
acetonitrila (1,5)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (12)	GC-MS	tujona e pulegona	bebidas	(ALSHISHANI <i>et al.</i> , 2018)
acetonitrila (0,4 e 0,5)	Na ₂ CO ₃ (0,05 e 0,13)	cromatografia de interação hidrofílica	biguanidas	plasma, urina e água de rio	(ALSHISHANI; SALHIMI; SAAD, 2018)
acetonitrila (10)	MgSO ₄ (4) e NaCl (1)	GC-MS	pesticidas	frutas e vegetais	(ANASTASSIADES <i>et al.</i> , 2003)
acetonitrila (3)	Na ₂ CO ₃ (1,27)	fluorescência	compostos policíclicos aromáticos	solo e sedimentos	(BREISSAN <i>et al.</i> , 2017)
acetonitrila (2)	MgSO ₄ (0,15) e NaCl (0,4)	HPLC-UV	compostos fenólicos	própolis	(CHEN <i>et al.</i> , 2019a)
acetonitrila (2,8)	Na ₂ CO ₃ (0,5)	HPLC-UV	5-hidroximetil-2-furfural	mel	(CHEN <i>et al.</i> , 2019b)
carbonato de dietila (0,25)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (28) e NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O (7)	HPLC-UV	clorofenóis	vinho	(FAN; HU; LIU, 2014)
acetonitrila (6) e 1,2-dibromoetano (0,05)	NaCl (7,2)	GC-FID	pesticidas	sucos, água de poço e água de rio	(FARAJZADEH; FERIDUNI; AFSHAR MOGADDAM, 2015)
acetonitrila (0,65)	MgSO ₄ (0,15) e NaCl (0,15)	HPLC-UV	antibióticos sulfonamidas	urina	(FIKAROVÁ <i>et al.</i> , 2021)
acetonitrila (2)	NaCl (0,13)	HPLC-UV e HPLC-FL	aminas biogênicas	carne e peixe	(FRANCISCO <i>et al.</i> , 2020)
etanol	(NH ₄) ₂ SO ₄	HPLC-UV	ácidos carboxílicos	padrões	(FU <i>et al.</i> , 2015)
acetonitrila (5)	MgSO ₄ (4)	HPLC-UV	resíduos de ciprofloxacina	água	(GEZAHEGN <i>et al.</i> , 2019)
acetonitrila (1,25)	NH ₄ CH ₃ CO ₂ (0,35)	HPLC-MS/MS	cocaína e anfetamina	mecônio	(GOGGIN; JANIS, 2019)

solvente de extração (mL)	sal (g)	técnica de análise	analito	amostra	referência
acetonitrila (1)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1,6)	HPLC-UV	herbicidas de sulfoniluréia	águas ambientais e suco de banana	(GURE <i>et al.</i> , 2014)
acetonitrila (0,3)	Na ₂ SO ₄ (0,1) e NaCl (0,02)	HPLC-MS	metoxetamina	amostras de tecidos	(HAJKOVA <i>et al.</i> , 2016)
acetonitrila (10)	MgSO ₄ (4), NaCl (1) e Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (1)	UHPLC-MS/MS	toxinas fusarium	leite vegetal	(HAMED <i>et al.</i> , 2017)
acetonitrila (2)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1,2)	UHPLC-MS/MS e UHPLC-UV	cianotoxinas	água salina	(HEMMATI <i>et al.</i> , 2019)
acetato de etila (10)	Na ₂ SO ₄ (1)	UHPLC-UV	5-nitroimidazol	leite	(HERNÁNDEZ-MESA <i>et al.</i> , 2017)
acetonitrila (5)	MgSO ₄ (0,5) e NaCl (0,1)	UHPLC-ESI-MS/MS	5-nitroimidazol e metabólitos	ovas de peixe	(HERNÁNDEZ-MESA; CRUCES-BLANCO; GARCÍA-CAMPAÑA, 2018)
acetonitrila (2)	NaCl (0,03)	UHPLC-UV	temozolomida	plasma	(JAIN <i>et al.</i> , 2014)
acetonitrila (0,2)	MgSO ₄ (0,2)	HPLC-UV	aminas biogênicas	sucos de fruta e bebidas alcoólicas	(JAIN; GUPTA; VERMA, 2015)
acetonitrila (2)	NaCl (3,3)	GC-FPD	pesticidas organofosforados	grão de cereal	(JIA <i>et al.</i> , 2014)
1-decanol (20)	K ₂ CO ₃ (30)	GC-TCD	morfolina	água	(KUMARI; VUPPALA; SATYAVATHI, 2020)
acetonitrila (100)	NaCl (130)	HPLC-UV	nitroaromáticos, nitraminas e ésteres de nitrato	água de poço	(LEGGETT; JENKINS; MIYARES, 1990)
acetonitrila (0,2)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (<0,09)	HPLC-UV	baicalina	plasma de rato	(LI <i>et al.</i> , 2014)
acetonitrila (0,15)	NaCl (0,15)	HPLC-UV	sulfonamidas	mel, águas ambientais e urina humana	(LIU J. <i>et al.</i> , 2010)
tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio (0,11)	K ₂ HPO ₄ (1)	HPLC-UV	sulfonamidas	sangue	(LIU <i>et al.</i> , 2016)
acetonitrila (0,3)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (0,2)	UHPLC-UV	β-bloqueadores e metabólitos	urina humana	(MAGIERA; KOLANOWSKA; BARANOWSKI, 2016)

solvente de extração (mL)	sal (g)	técnica de análise	analito	amostra	referência
etanol	(NH ₄) ₂ SO ₄	ELECNRTL	ácido láctico	água	(MARCHESAN <i>et al.</i> , 2020)
tolueno (1,5) e acetona (3,5)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1)	UHPLC-MS	ocratoxina A	cerveja	(MARIÑO-REPIZO <i>et al.</i> , 2018)
isopropanol (0,2)	MgSO ₄ (0,012)	HPLC-FL	perampanel e estiripentol	rato	(MEIRINHO <i>et al.</i> , 2020)
acetonitrila (3,2)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1,25)	UHPLC-MS/MS	resíduos de tetraciclina	alimentos infantis	(MORENO-GONZÁLEZ; GARCÍA-CAMPAÑA, 2017)
acetonitrila (1) e acetona (3)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1,3)	UHPLC-MS/MS	antibióticos betalactama	laticínios infantis	(MORENO-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2017)
acetonitrila (0,4)	NH ₄ HCO ₂ (0,02) e NH ₄ HCO ₃ (0,03)	HPLC-MS/MS	estimulantes semelhantes a anfetaminas	mecônio	(NEMEŠKALOVÁ <i>et al.</i> , 2019)
acetonitrila (2)	NaCl (1,16)	GC-MS	inseticidas piretróides	urina, água do mar e esgoto	(NIU <i>et al.</i> , 2017)
acetato de etila (1,5)	NaCl (0,4)	GC-PTV-MS	drogas não esteroidais e anti-inflamatórias	água	(NOCHE <i>et al.</i> , 2011)
acetonitrila (0,15)	NH ₄ HCO ₂ (0,032)	HPLC-MS/MS	anandamida e 2-araquidonoilglicerol	cérebro de rato	(OLIVEIRA; QUEIROZ, 2020)
acetonitrila (1)	MgSO ₄	LC-MS/MS	entecavir	plasma humano	(ZHAO <i>et al.</i> , 2012)
acetonitrila (0,2)	MgSO ₄ (0,012)	LC-MS/MS	lopinavir e ritonavir	plasma	(ZHANG <i>et al.</i> , 2009)
acetonitrila	NaCl	UHPLC-ESI-MS/MS	isoflavonas	leite de soja	(PARK; JUNG, 2017)
acetonitrila (0,6)	NaOH (0,014)	FS-OP	diclofenaco	saliva humana	(POCHIVALOV <i>et al.</i> , 2017)
acetonitrila (1)	NaCl (0,13)	HPLC-FLD	aminas biogênicas	vinho	(RAMOS; VALENTE; RODRIGUES, 2014)
acetonitrila (2)	NaCl (0,13)	HPLC-UV-MS/MS	aminas biogênicas	queijo	(RAMOS; BRANDÃO; RODRIGUES, 2020)
acetonitrila (4,5)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1)	espectrometria	azul de metileno e amarelo crepúsculo	esgoto e alimentos sólidos	(RAZMARA; DANESHFAR; SAHRAI, 2011)
acetonitrila (2)	NaCl	UHPLC-MS/MS	cloranfenicol	mel	(RIZZO <i>et al.</i> , 2020)

solvente de extração (mL)	sal (g)	técnica de análise	analito	amostra	referência
metilisobutilcetona e metilisopropilcetona	KCl e NaCl	GC-FID	ácido propanoico	padrões	(ROY; AWUAL; GOTO, 2007)
acetato de etila (0,75)	NaCl	GC-MS	aminas aromáticas	tecidos e algodão	(SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2014)
acetonitrila (3)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (7)	HPLC-DAD	vitamina D3	leite	(SAZALI <i>et al.</i> , 2019)
acetonitrila (0,25)	NaCl	HPLC-UV	sulfanilamida	chá, água, leite, mel, urina humana, sangue e plasma	(SERESHTI; KHOSRAVIANI; SADEGH AMINI-FAZL, 2014)
acetonitrila	MgSO ₄ , NaCl, C ₆ H ₉ Na ₃ O ₉	LC-MS/MS	canabinóides	plasma	(SILVA <i>et al.</i> , 2020)
acetato de etila/ácido fórmico, acetonitrila/ ácido fórmico	MgSO ₄	LC-MS/MS	micotoxinas	urina de porco	(SONG <i>et al.</i> , 2013)
acetonitrila (0,025)	MgCl ₂ (0,0014)	LC-MS/MS	afatinib	plasma	(SPARIDANS <i>et al.</i> , 2016)
acetonitrila (2,35)	Na ₂ SO ₄ (0,33)	UHPLC-FLD	doxorrubicina	urina	(STRATIGOU <i>et al.</i> , 2020)
acetonitrila (1,25)	NaCl (1,5)	espectrometria	fenóis	padrões	(TABARAKI; HEIDARIZADI, 2019)
acetonitrila (1)	NH ₄ CH ₃ CO ₂ (0,03)	HPLC-PDA	febuxostato	plasma	(TANDEL <i>et al.</i> , 2016)
acetonitrila (2)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1,6)	UHPLC-FL	benzimidazol	peixes de viveiro	(TEJADA-CASADO <i>et al.</i> , 2018b)
acetonitrila (2)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1,6)	CLC-UV	benzimidazoles	leite	(TEJADA-CASADO <i>et al.</i> , 2018a)
etanol:acetona (0,5)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1,7)	UHPLC-UV	aditivos alimentares	sucos	(TIGHRINE <i>et al.</i> , 2019)
diclorometano (3)	NaCl	GC-MS	caprolactama e 2,4-DTBP	água	(TSOCHATZIS <i>et al.</i> , 2020)
acetonitrila (2)	NaCl (0,25)	HPLC-FLD	carbamato de etila	bebidas	(VALENTE <i>et al.</i> , 2014)
acetonitrila (5)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1)	HPLC-UV-MS/MS e GC-MS	fenóis	sementes de funcho	(VALENTE <i>et al.</i> , 2017a)

solvente de extração (mL)	sal (g)	técnica de análise	analito	amostra	referência
acetonitrila (10)	NaCl (0,325)	CE-PDA	enantiômeros de varfarina	urina	(WANG; CAI; XU, 2011)
acetonitrila (5)	NH ₄ CH ₃ CO ₂ (2)	LC-MS/MS	hormônios esteróides	tecidos de peixe	(WANG <i>et al.</i> , 2012)
acetonitrila (1,6)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (2)	UPLC-MS/MS	bisfenol A e análogos	bebidas de café	(WANG <i>et al.</i> , 2021)
acetonitrila (0,4)	NH ₄ Cl (0,5)	HPLC-UV	drogas anti-hipertensivas	águas ambientais	(WANG; YIN; XU, 2013)
acetonitrila (0,2)	NH ₄ CH ₃ CO ₂ (0,007)	LC-MS/MS	droga (ABT-869 e A-849529)	plasma humano	(WU <i>et al.</i> , 2008)
acetonitrila (3)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (3,6)	espectrometria	fluoroquinolonas	leite	(XIA; YANG; LIU, 2012)
acetonitrila (0,2)	NH ₄ HCO ₂ (0,016)	LC-MS/MS	anandamida	plasma humano	(XIONG <i>et al.</i> , 2015)
acetonitrila (0,1)	NH ₄ HCO ₂ (0,008)	LC-MS/MS	trimetazidina	plasma de rato	(XIONG; YANG, 2015)
acetonitrila (0,4)	NH ₄ CH ₃ CO ₂ (0,046)	LC-MS/MS	atorvastatina, <i>o</i> -hidroxiatorvastatina e <i>p</i> -hidroxiatorvastatina	plasma humano	(YANG <i>et al.</i> , 2015)
clorofórmio (0,055)	NaCl (0,25)	GD-ECD	pesticidas organoclorados	água e frutas	(YAZDANFAR; YAMINI; GHAMBARIAN, 2014)
2-etil-1-hexanol	NaCl	GC-TCD	isobutanol	soluções aquosas	(YI <i>et al.</i> , 2018)
acetonitrila (0,2)	NH ₄ HCO ₂ (0,016)	LC-MS/MS	sinsvastatina e ácido de sinsvastatina	plasma humano	(ZHANG <i>et al.</i> , 2010)

Fonte: Elaborado pela Autora (2022).

2.2 Validação de métodos analíticos

O processo de validação de um método analítico é realizado com o objetivo de demonstrar que um procedimento experimental é adequado para a determinação e quantificação dos analitos de interesse e garante que os resultados fornecidos por esse procedimento são confiáveis. Cada país segue as normas estabelecidas pelas agências reguladoras oficiais, no caso do Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), do Ministério da Saúde. Os procedimentos recomendados pela ANVISA para validação de métodos são muito similares às recomendações adotadas pela agência dos Estados Unidos, *Food and Drugs Administration* (FDA) e da Europa, pela Comunidade Europeia. INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) também são agências reguladoras importantes a serem consideradas na validação de métodos (PASCHOAL *et al.*, 2008).

Os principais parâmetros analíticos utilizados para validação de métodos de são seletividade, linearidade e faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

A seletividade demonstra que um método é capaz de quantificar com exatidão o analito, mesmo que haja impurezas ou interferências da matriz. Interferentes costumam ser compostos com estrutura semelhante ao analito, isômeros, substâncias que possam estar presentes no mesmo meio que os analitos de interesse, produtos de degradação, metabólitos e impurezas (BRASIL, 2003; PASCHOAL *et al.*, 2008). A verificação da seletividade depende do método analítico empregado. Para os métodos cromatográficos, por exemplo, verifica-se que o pico de resposta é proveniente do analito e não de outros interferentes presentes na amostra (PASCHOAL *et al.*, 2008).

A linearidade demonstra que a resposta da técnica de análise empregada é diretamente proporcional às concentrações do analito, permitindo obter a regressão da curva analítica. São recomendados 5 níveis de concentração do analito para a construção da curva analítica. Valores do coeficiente de determinação maiores do que 0,99 são recomendados para considerar que existe uma linearidade na resposta (BRASIL, 2003).

A sensibilidade não é um parâmetro requisitado pelos órgãos oficiais para a validação de métodos analíticos, no entanto é expressa de forma indireta pela

equação da reta obtida através da regressão linear da curva analítica. O coeficiente angular da curva analítica fornece informações sobre a sensibilidade do método, ou seja, a alteração da resposta em função da variação da concentração do analito (PASCHOAL *et al.*, 2008).

A influência da matriz que contém o analito na extração é avaliada adicionando diferentes concentrações conhecidas do analito de interesse às amostras que serão analisadas. A inclinação da curva de calibração e a inclinação da curva com adição de padrão são comparadas através do teste t de *Student*, geralmente com 95 % de confiança, para verificar se ambas podem ser consideradas estatisticamente iguais ou não, dentro do limite de confiança. Caso seja verificado que as curvas são estatisticamente diferentes, a curva de adição de padrão deve ser o método escolhido para a quantificação das amostras. O valor de t tabelado é comparado ao valor de t calculado, através da equação 1.

$$t_{calc} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{s(a_1)^2 + s(a_2)^2}} \quad (1)$$

onde a_1 e a_2 são o coeficiente angular da curva analítica na ausência e na presença da matriz, respectivamente, e $s(a_1)$ e $s(a_2)$ correspondem aos desvios da inclinação.

A precisão indica quanto os resultados de testes independentes realizados sob as mesmas condições estão próximos entre si, esse parâmetro é verificado pela estimativa do desvio padrão (s) ou do desvio padrão relativo (DPR) obtidos para o conjunto de amostras analisadas. Nos procedimentos experimentais, a precisão é fornecida pela repetibilidade e reprodutibilidade de amostras da mesma matriz enriquecidas com concentrações conhecidas do analito de interesse (PASCHOAL *et al.*, 2008). A repetibilidade corresponde ao desvio entre amostras analisadas nas mesmas condições dentro de um curto período de tempo. Já a reprodutibilidade corresponde ao desvio obtido para amostras em laboratórios diferentes. É recomendado que sejam feitas um mínimo de seis determinações para uma mesma concentração de analito e que o DPR obtido para essas análises não exceda 15 % (BRASIL, 2003).

A exatidão avalia quanto a concentração de analito obtida pelo método está próxima do que seria a sua concentração real. Concentrações conhecidas de soluções de padrões do analito são adicionadas à matriz das amostras, que são

analisadas de acordo com o procedimento proposto. A concentração experimental é calculada através da curva analítica obtida pelo método. Esse parâmetro é avaliado pela recuperação, expressa em porcentagem, e reflete a eficiência de extração do método. É recomendado que sejam feitos ensaios em triplicata para três níveis de concentração do analito adicionado à amostra (BRASIL, 2003). A recuperação varia entre concentrações baixas e altas do analito, apresentando uma dispersão maior entre os resultados para concentrações baixas. Valores de recuperação entre 70 % e 120 % são considerados aceitáveis para análise de componentes traços (RIBANI *et al.*, 2004). A recuperação é calculada de acordo com a equação 2.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração determinada do analito}}{\text{concentração esperada do analito}} \times 100 \% \quad (2)$$

O limite de detecção (LD) indica a menor concentração do analito que pode ser diferenciada de zero ou do ruído de fundo e, portanto, que pode ser detectada de forma confiável pelo método avaliado (BRASIL, 2003; PASCHOAL *et al.*, 2008). O LD pode ser calculado através da menor relação sinal-ruído ou através de parâmetros da curva analítica. Pelos parâmetros da curva analítica, o LD é calculado como 3,3 vezes a razão entre o desvio padrão da regressão linear (s_a) e a inclinação (a) (coeficiente angular) da curva analítica, segundo a equação 3.

$$LD = 3,3x \frac{s_a}{a} \quad (3)$$

O limite de quantificação representa a menor quantidade de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão pelo método proposto (BRASIL, 2003; PASCHOAL *et al.*, 2008). O LQ é calculado da mesma forma que o LD, porém com uma relação de 10 vezes para a razão entre o desvio padrão da regressão linear (s_a) e a inclinação (a) (coeficiente angular) da curva analítica, de acordo com a equação 4.

$$LD = 10x \frac{s_a}{a} \quad (4)$$

3 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para extração, separação e quantificação de compostos de interesse alimentício utilizando a técnica de extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE) em combinação com técnicas analíticas cromatográficas, eletroanalíticas e espectrométricas para determinação de aminas biogênicas em amostras de produtos alimentares de origem animal e de aldeídos em amostras de café.

4 CAPÍTULO I – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA SALLE PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM PRODUTOS ALIMENTARES DE ORIGEM ANIMAL

Neste Capítulo é apresentado o trabalho desenvolvido para determinação de aminos biogênicas em carnes e peixes utilizando a SALLE para melhorar a extração das aminos das amostras. A etapa de SALLE foi realizada simultaneamente com a derivatização, possibilitando reduzir o número de etapas do procedimento. As análises foram feitas por HPLC com detectores UV e FL.

Uma SALLE também foi aplicada para a extração de histamina de peixes e determinação por análise colorimétrica.

Uma revisão sobre aminos biogênicas em produtos alimentícios, seus efeitos à saúde humana e suas principais vias de formação, assim como procedimentos analíticos empregados para detectá-las também são apresentados no Capítulo I.

4.1 Introdução

Uma grande variedade de alimentos e bebidas que contêm aminos biogênicas (ABs) fazem parte da dieta humana. Alimentos como leites e derivados, vinhos, carnes e peixes quando são submetidos a condições inadequadas de higiene durante sua cadeia de produção, podem apresentar concentrações elevadas de ABs e representar um problema à saúde. Indiretamente, a concentração de ABs nos alimentos pode fornecer informações sobre o estado de degradação que o alimento se encontra, portanto, pode ser um indicador da qualidade alimentar.

O desenvolvimento de novos métodos de extração e análise que permitam monitorar a qualidade dos alimentos e também avaliar a eficiência dos processos tecnológicos utilizados para diminuir a formação de ABs constituem um desafio analítico. Neste trabalho, a técnica SALLE é proposta para realizar a extração de ABs de amostras alimentares, em uma etapa realizada simultaneamente com a derivatização dessas aminos para que sejam determinadas por HPLC-UV e HPLC-FL. Também foi acrescentada à esta proposta um método para extração de histamina por SALLE e determinação por espectrofotometria na região do visível. O método foi otimizado e os parâmetros analíticos foram validados para permitir a aplicação na análise de ABs em amostras de peixes e carnes.

4.2 Revisão Bibliográfica

Aminas biogênicas (ABs) são bases orgânicas nitrogenadas formadas a partir da descarboxilação de aminoácidos livres específicos. São produzidas de forma natural nas células vivas e desempenham importantes papéis fisiológicos no organismo humano. Entretanto, em alimentos e bebidas que contêm proteínas e aminoácidos livres, a descarboxilação é promovida por enzimas microbianas. Microrganismos com atividade descarboxilase podem ser intencionalmente inseridos em alguma etapa do processamento dos alimentos ser resultado da adoção de condições higiênicas insatisfatórias durante sua produção ou armazenamento (SPANNO *et al.*, 2010). Embora as ABs desempenhem funções biológicas fundamentais, seu consumo em elevadas concentrações pode causar efeitos adversos à saúde humana (AL BULUSHI *et al.*, 2009). Em um ambiente favorável à atividade enzimática microbiana, peixes e frutos do mar que possuem muita histidina livre nos tecidos musculares podem apresentar elevadas concentrações de histamina e desencadear quadros de intoxicação alimentar quando consumidos. Além disso, em alimentos processados que contêm nitratos e nitritos como conservantes, a presença de aminas biogênicas gera uma predisposição para a formação de nitrosaminas, compostos reconhecidos como carcinogênicos (MEY *et al.*, 2014).

Dessa forma, o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de ABs em alimentos e bebidas e a aplicação de técnicas que visem diminuir sua formação podem colaborar para um maior controle da qualidade alimentar e beneficiar a saúde humana. Algumas dificuldades encontradas na análise de ABs em alimentos se dão devido à frequentemente estarem presentes em concentrações baixas, à complexidade dessas amostras, à alta polaridade dos compostos e à ocorrência de várias aminas simultaneamente no mesmo meio. A análise desses compostos requer etapas de pré-tratamento da amostra, que envolve a extração das aminas da matriz alimentar e sua concentração em níveis adequados que permitam a determinação analítica (JAIN; VERMA, 2018).

4.2.1 Definição e classificação de aminas biogênicas

Aminas biogênicas são bases orgânicas nitrogenadas de baixa massa molecular em que um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia foi substituído por um grupo alquil ou arila (ALVAREZ; MORENO-ARRIBAS, 2014). Essas substâncias são formadas naturalmente durante processos bioquímicos nos seres vivos pois participam de diversas funções metabólicas e fisiológicas no organismo. São encontradas também em alimentos de origem animal, vegetal e alimentos fermentados (SARKADI, 2009).

Existe uma grande diversidade estrutural de ABs e elas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura química, com o número de grupamentos amina que a molécula apresenta e com a via biossintética de sua formação. Em relação a estrutura química, podem ser classificadas como alifáticas (putrescina, cadaverina, agmatina, espermina e espermidina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) ou heterocíclica (histamina, triptamina e serotonina). Consoante o número de grupamentos amina podem ser divididas em monoaminas (tiramina, metilamina, etilamina, feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) ou poliaminas (agmatina, espermina e espermidina) (SPANO *et al.*, 2010). Uma outra classificação leva em consideração a via biossintética de formação, assim existem as aminas naturais (espermina, espermidina e putrescina), cuja biossíntese ocorre *in situ* na célula, ou seja, a partir de uma molécula mais simples, conforme são requeridas pelo organismo, ou quando estão armazenadas nos masófilos e basófilos, e aminas biogênicas formadas pela descarboxilação de aminoácidos livres específicos através de enzimas microbianas, que é a principal via de formação de aminas nos alimentos.

Em sua maioria as aminas biogênicas são denominadas de acordo com o aminoácido que as origina, assim histamina (HIM), tiramina (TIM), 2-feniletilamina (FEM) e triptamina, por exemplo, são formadas a partir da descarboxilação de histidina, tirosina, fenilalanina e triptofano, respectivamente. Os nomes cadaverina (CAD) e putrescina (PUT), entretanto, relacionam-se com o fato dessas aminas serem encontradas em materiais em estado de decomposição ou putrefação. Já espermidina (SPD) e espermina (SPM) recebem essa denominação pois foram isoladas e determinadas pela primeira vez em fluido seminal de peixe (SARKADI, 2009).

4.2.2 Formação de aminas biogênicas

As aminas biogênicas podem ter origem endógena, quando formadas nos próprios organismos, ou exógena, quando formadas nos alimentos a partir da descarboxilação de aminoácidos livres específicos. Algumas aminas podem ser formadas por ambas as vias biossintéticas, no entanto, nos alimentos, a descarboxilação microbiana constitui a principal via de formação.

A produção de aminas biogênicas nos seres vivos é necessária pois elas participam de diversas funções metabólicas e fisiológicas. Durante o metabolismo normal os seres vivos sintetizam aminas biogênicas através da descarboxilação de aminoácidos livres específicos, pela hidrólise ou decomposição térmica de compostos nitrogenados e pela aminação e transaminação de aldeídos e cetonas (SARKADI, 2009).

Em uma grande variedade de alimentos e bebidas que contêm proteínas ou aminoácidos pode ocorrer a formação de aminas biogênicas, entre eles destacam-se peixes, carnes, vinhos, queijos, vegetais e alimentos fermentados (DOEUN; DAVAATSEREN; CHUNG, 2017; SENTELLAS; NÚÑEZ; SAURINA, 2016). Nesses produtos a formação das aminas é promovida, principalmente, pela descarboxilação enzimática microbiana de aminoácidos livres específicos, ou seja, pela remoção de um grupo α -carboxil do aminoácido para dar origem a amina correspondente (SARKADI, 2009). Os microrganismos com atividade descarboxilase podem estar naturalmente presentes no alimento, podem ser intencionalmente inseridos em alguma etapa do processamento do alimento (como para a obtenção de produtos fermentados) ou podem ser um contaminante resultante da adoção de condições higiênicas inadequadas durante sua produção, processamento ou armazenamento (SPANO *et al.*, 2010). A natureza e origem do alimento, os aminoácidos livres disponíveis, os microrganismos com atividade descarboxilases sobre esses aminoácidos, as etapas envolvidas no seu processamento, o pH do meio, a temperatura, a presença de coenzimas e vitaminas, a tensão de oxigênio e a concentração de carbonatos fermentáveis são fatores que determinam a quantidade e o tipo de aminas que serão formadas (ALVAREZ; MORENO-ARRIBAS, 2014). Em condições higiênicas insatisfatórias e em condições de *stress*, como alteração de temperatura, diminuição de disponibilidade de água e deficiência de minerais, ocorre um aumento da atividade microbiana, o que favorece a formação e acumulação de

ABs (SPANO *et al.*, 2010). A concentração de ABs nos alimentos pode ser, portanto, um importante indicador químico do grau de degradação e qualidade do alimento (CHONG *et al.*, 2014; CUSTÓDIO; THEODORO; GLORIA, 2016; GALGANO *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ-JOVER *et al.*, 1997; LÁZARO *et al.*, 2015; TRIKI *et al.*, 2018; VINCI; ANTONELLI, 2002; WOJNOWSKI; NAMIEŚNIK; PŁOTKA-WASYLKA, 2019).

Escherichia, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Propionobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* são alguns dos microrganismos com atividade descarboxilase que podem produzir ABs nos alimentos (GARDINI *et al.* 2016). A descarboxilação de aminoácidos é um mecanismo que os microrganismos utilizam para sobreviverem em ambientes ácidos, e é favorecida em pH com valores entre 2,5 a 6,5. Com o consumo dos prótons fornecidos pelos aminoácidos, a formação de aminas e liberação de CO₂, o pH interno é restabelecido e assim os microrganismos garantem a sua sobrevivência. A descarboxilação fornece também uma forma de obtenção de energia para microrganismos que possuem uma cadeia respiratória deficiente, pois durante a formação de aminas ocorre também uma elevada produção de adenosinatrifosfato (ADP). Como a formação de ABs depende da ação de enzimas descarboxilases, a temperatura é um fator de grande importância no processo. Em temperaturas inferiores a 30 °C as decarboxilases estão mais ativas, na faixa de temperatura de 0 a 10 °C a atividade descarboxilase depende da microbiota presente, e acima de 40 °C estão inativadas (SPANO *et al.*, 2010).

Muitas das ABs são formadas diretamente a partir de aminoácidos precursores através de enzimas descarboxilases, como metilamina (MET), dimetilamina (DIM), etilamina (ETI), 2-feniletilamina (FEM), isopentilamina (ISO), cadaverina (CAD), histamina (HIM) e tiramina (TIM), já outras, como a putrescina (PUT), espermidina (SPD) e espermina (SPM), seguem vias biossintéticas que dependem de várias etapas e enzimas. O caminho que a reação irá seguir é influenciado pelos microrganismos presentes, enzimas que eles contêm e o nicho ecológico que o organismo pertence. A Figura 2 ilustra as principais vias de formação das aminas biogênicas e respectivas enzimas envolvidas nesse processo.

A formação da putrescina pode ocorrer por vários caminhos de reação, como ilustrado na Figura 3. Diretamente a putrescina pode ser formada pela descarboxilação da ornitina, pela ornitina descarboxilase, e pela agmatina (AGM),

a S-adenosilmetionina e, através da S-adenosilmetionina descarboxilase, forma a S-adenosilmetionina descarboxilada, que fornece um grupo propilamina à putrescina através da espermidina sintase e forma a espermidina. A transferência de outro grupamento propilamina à espermidina através da espermina sintase forma a espermina (BENKERROUM, 2016).

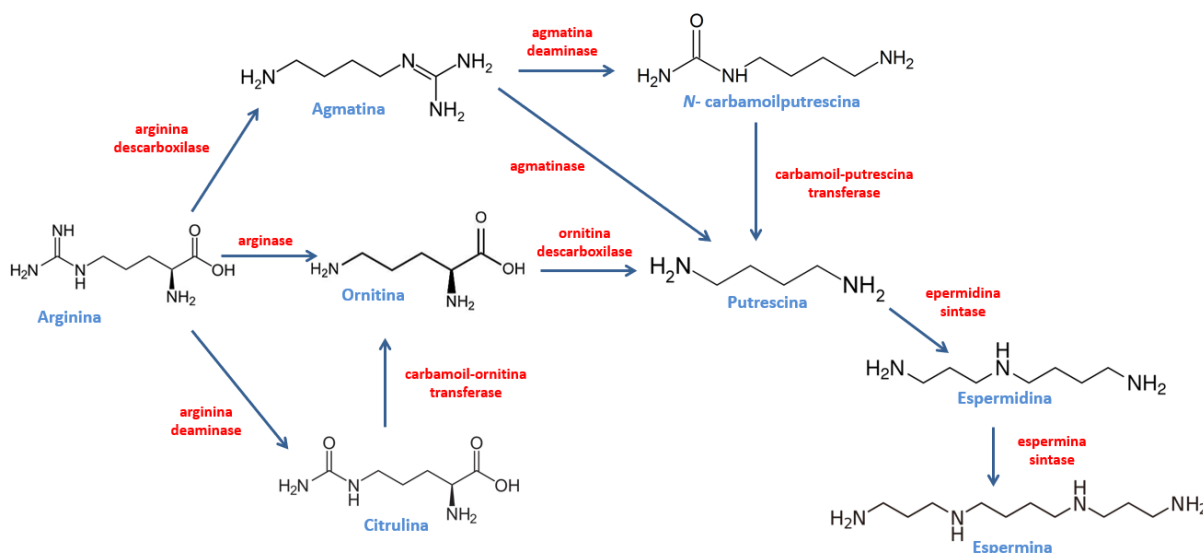


Figura 3 – Principais rotas biossintéticas para a formação de putrescina
Fonte: Elaborada pela Autora (2019).

4.2.3 Papel fisiológico das aminas biogênicas

As aminas biogênicas são sintetizadas de forma natural pelas células pois desempenham importantes papéis fisiológicos e metabólicos nos seres vivos (SPANO *et al.*, 2010). No organismo humano atuam como reguladoras da secreção gástrica, da temperatura corporal, do sistema nervoso central e periférico e da pressão sanguínea. Também são fontes de nitrogênio para o organismo e essenciais para o crescimento e proliferação celular, biossíntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA), proteínas e hormônios (SARKADI, 2009). Histamina, serotonina e dopamina, por exemplo, são psicoativas e atuam no sistema nervoso e no sistema vascular, como vasoconstritoras ou vasodilatadoras. Tiramina, 2-feniletilamina, triptamina (TRI) e dopamina são reconhecidas por constrigir o sistema vascular e causar um aumento na pressão arterial, enquanto a histamina atua como um vasodilatador e diminui a pressão arterial. A histamina também atua como um mediador químico e neurotransmissor, tem fundamental importância na resposta

alergênica, nos processos de inflamação, na regulação do sono e no controle das secreções estomacais (FEDDERN *et al.*, 2019).

As poliaminas, espermidina e espermina são essenciais no crescimento e proliferação celular, na síntese de DNA, RNA e proteínas, na regulação hormonal e na estabilização das funções dos cromossomos e membranas. Essas moléculas são polications com 4 cargas positivas na espermina e 3 na espermidina e tem alta afinidade com outros compostos iônicos. Essa característica permite que inibam a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados e estabilizem radicais livres *in vitro*, se associem com componentes da membrana celular eletricamente carregados, como os fosfolípidos, atuando na permeabilidade e estabilidade da membrana. Também atuam como reguladoras da estabilidade da dupla hélice de DNA, na iniciação e no controle da translação, estimulando a associação de subunidades do ribossomo, estabilizam a estrutura do RNA transportador e reduzem a taxa de degradação do RNA. Além disso, também possuem grande importância na manutenção da atividade metabólica do trato digestivo. As poliaminas não são associadas ao surgimento de câncer, porém podem causar aceleração do crescimento de tumores (FEDDERN *et al.*, 2019).

4.2.4 Efeitos tóxicos das aminas biogênicas

Embora muitas aminas tenham funções biológicas fundamentais, o consumo de alimentos e bebidas que contêm elevadas concentrações de ABs pode ser prejudicial e causar efeitos toxicológicos à saúde humana (AL BULUSHI *et al.*, 2009; EFSA, 2011). No trato gastrointestinal humano estão presentes aminoxidases, como monoaminaoxidase (MAO), diaminaoxidase (DAO) e poliaminaoxidase (PAO), que catalisam a degradação das aminas e auxiliam a destoxificar rapidamente o organismo, portanto, a ingestão de baixas concentrações de ABs não é considerada uma ameaça preocupante à saúde humana (SARKADI, 2009). A histamina, por exemplo, pode ser degradada por dois principais caminhos de reação, representados na Figura 4. Em um deles, a histamina é oxidada a imidazol acetaldeído pela DAO e transformada em ácido imidazolacético. No outro caminho, a histamina é metilada pela histamina *N*-metil transferase, formando uma *N*-metil-histamina, que é oxidada pela MAO à *N*-metil-imidazol acetaldeído e, a seguir, oxidada à ácido *N*-metil-imidazolacético. Os produtos da reação são então

eliminados pelo organismo pela urina. Entretanto, quando altas concentrações de ABs são ingeridas e entram no sistema circulatório, ou quando o sistema de desintoxicação é deficiente, provocam diversos efeitos adversos no organismo. A intoxicação alimentar mais frequente relacionada a aminas é causada pela histamina, que ocasiona uma vasodilatação, diminuição da pressão sanguínea, erupções cutâneas, cefaléia intensa, tontura, dores abdominais, sensação de ardor na boca e garganta e dificuldade de deglutição (AL BULUSHI *et al.*, 2009; FENG; TEUBER; GERSHWIN, 2016; PRESTER, 2011).

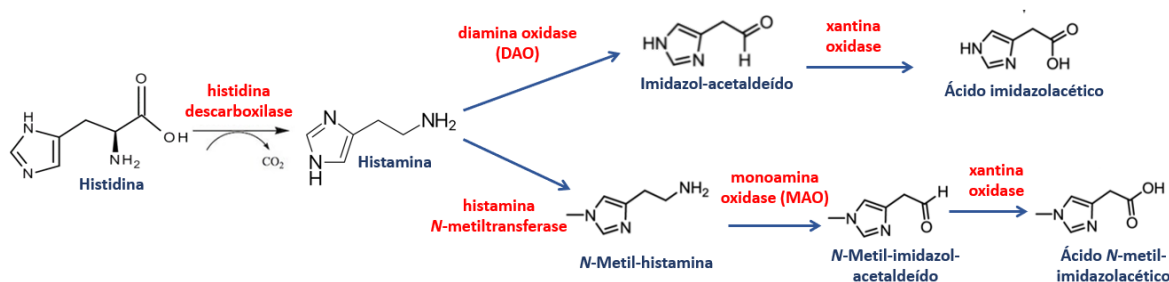


Figura 4 – Reação de degradação da histamina

Fonte: Adaptada de Glória (2005).

As elevadas temperaturas as quais um alimento é submetido durante o cozimento são capazes de destruir a bactéria responsável pela formação das aminas biogênicas, porém esse processo não destrói o agente tóxico, de forma que o consumo desse alimento ainda constitui um fator de risco à saúde (SARKADI, 2009). A intoxicação por histamina está relacionada, principalmente, a peixes e frutos do mar que possuem elevada concentração de histidina nos tecidos musculares, uma vez que, em um ambiente favorável a atividade enzimática microbiana, a histidina sofre descarboxilação e origina a histamina (AL BULUSHI *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2016). Os peixes com predisposição a apresentarem elevadas concentrações de histamina são chamados de peixes escombrídeos, por pertencerem a família *Scombridae*, e seu consumo pode causar uma intoxicação alimentar chamada de intoxicação escombríde. A intoxicação escombríde causa sintomas como diarreia, urticária, vômito, febre e dificuldade respiratória (PRESTER, 2011). Algumas aminas, principalmente cadaverina e putrescina, apesar de não possuírem efeitos tóxicos diretos, em altas concentrações causam a inibição das enzimas metabolizadoras de histamina, a diamina oxidase e a histamina metil transferase, e potencializam a intoxicação por histamina (AL BULUSHI *et al.*, 2009; SARKADI, 2009).

A tiramina é a segunda amina mais reportada em casos de intoxicações alimentares. Em elevadas concentrações, a tiramina libera noradrenalina no sangue e causa um aumento da pressão sanguínea, além de sintomas como enxaqueca, hemorragia intracraniana, febre e vômito. A eficiência do sistema de desintoxicação de ABs depende das características genéticas de cada indivíduo, além disso alguns medicamentos, como antidepressivos e bloqueadores neuromusculares, drogas e álcool inibem a ação das aminoxidases e potencializam os efeitos toxicológicos de histamina e tiramina no organismo (SPANO *et al.*, 2010).

Altas ingestões de triptamina e 2-feniletilamina também são conhecidas por provocarem sintomas parecidos com os causados pela ingestão de tiramina. Essas aminas podem apresentar concentrações elevadas em queijos, que é o principal alimento associado a esse tipo de intoxicação.

As poliaminas, espermidina e espermina, já foram associadas a crescimento de tumores e para pacientes em tratamento oncológico recomenda-se seguir uma dieta restrita nessas aminas (FEDDERN *et al.*, 2019).

Outro efeito adverso à saúde humana associado ao consumo das aminas biogênicas está relacionado a alimentos processados, como carne e embutidos. Na produção desses alimentos costumam ser adicionados sais de nitratos e nitritos com o objetivo de promover a coloração e aroma desejados no alimento, retardar a oxidação lipídica e inibir a proliferação de microrganismos como *Clostridium botulinum*, gênero de bactéria que transmite botulismo (RUIZ-CAPILLAS; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004). Apesar das vantagens, o nitrito é uma substância que em produtos cárneos sofre muitas reações e por isso seu uso é limitado ao valor máximo de 150 mg kg⁻¹ (HONIKEL, 2008). No ambiente ácido estomacal, o nitrito pode ser convertido para o agente de nitrosação NO⁺ e reagir com as aminas biogênicas, formando N-nitrosaminas, que são compostos carcinogênicos (DRABIK-MARKIEWICZ *et al.*, 2011; MEY *et al.*, 2014). Cadaverina, putrescina, metilamina e as poliaminas, espermidina e espermina, podem atuar como precursoras de nitrosaminas carcinogênicas (PRESTER, 2011; WUNDERLICHOVÁ *et al.*, 2014). A Figura 5 exemplifica a formação de nitrosaminas a partir de aminas secundárias.

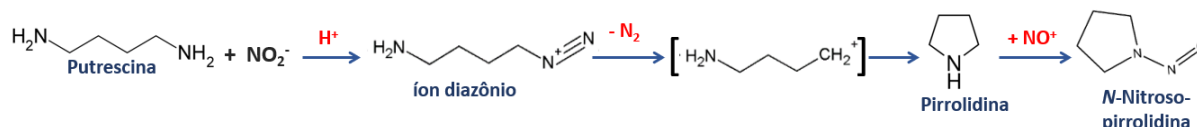


Figura 5 – Formação de nitrosaminas

Fonte: Elaborada pela Autora (2019).

4.2.4.1 Efeitos toxicológicos de aminas em animais

Cães compartilham o mesmo habitat e muitas vezes o mesmo alimento ou tipo de alimentação que os humanos. A microbiota bacteriana dos cachorros contém uma grande variedade de microrganismos metabolicamente ativos que tem grande influência na saúde do animal. Essa microbiota é capaz de fermentar carboidratos e proteínas complexas e produzir múltiplos produtos. O tipo e quantidade de produtos formados depende das espécies da microbiota e dos substratos disponíveis para serem consumidos pelos microrganismos (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Fruto-oligossacarídeos, como oligofrutose e inulina, são exemplos de constituintes destinados a suplementação alimentar canina que possuem algumas propriedades funcionais e nutricionais, podem alterar benéficamente a população microbiana no intestino e ajudam na prevenção de bactérias patogênicas. Pouco se conhece, porém, sobre a concentração ideal de fructantes para a suplementação da alimentação canina em face a aumentar os efeitos benéficos e minimizar os efeitos adversos. Propst *et al.* (2003) observou um aumento nas concentrações de cadaverina, putrescina e espermidina nas fezes de cães alimentados com suplementação a base de oligofrutose. Este resultado indica que a suplementação com oligofrutose causou um aumento na concentração de aminas biogênicas no intestino. O aumento dessas substâncias estimula o processo de crescimento celular. Quando a proliferação de células é requerida, a presença de poliaminas é benéfica, entretanto, quando já está adequada, a adição de poliaminas no organismo pode provocar efeitos adversos à saúde, como estimular a produção de tumores e aumentar a incidência de câncer de cólon (PROPST *et al.*, 2003).

DelValle e Yamada (1990) observaram que o consumo de ETI, FEM e TRM causou um aumento de secreções gástricas ácidas em cães. A estimulação a ocorrência dessas secreções pode ocorrer devido a interação de constituintes do alimento com componentes do estômago e estudos sugerem que as aminas biogênicas podem ser um de seus principais estimulantes.

A histamina é uma substância vasoativa que tem capacidade de causar efeitos diretos na alteração da permeabilidade nos vasos sanguíneos da circulação pulmonar e branquial em diversas espécies. Pietra *et al.* (1971) administraram 0,1 a 100 µg de histamina de forma intravenosa em cachorros e observaram um aumento de vazamento nos vasos sanguíneos dos bronquíolos conforme aumentava a dose de histamina injetada. Após a injeção, também foi observado um efeito de grande broncoconstrição das vias aéreas, o que pode contribuir para a produção de edemas peribronquiais. Owen (1975) injetou histamina de forma intravenosa em gatos e observaram diminuição da pressão sanguínea após injeção.

A espermina tem uma resposta semelhante a prostamina na coagulação sanguínea, ambas em elevadas concentrações atuam como anticoagulantes. Tabor e Rosenthal (1956) adicionaram quantidades entre 0,6 e 2,4 mg de espermina à 1 mL de sangue canino e observaram uma crescente diminuição na coagulação sanguínea. Estudos realizados em animais anestesiados observaram uma diminuição da pressão sanguínea após injeção intravenosa de espermina e diminuição de batimentos cardíacos e respiratórios com adição de doses superiores a 0,1 mM kg⁻¹ (TABOR; TABOR, 1964).

4.2.5 *Produtos alimentares que contêm aminas biogênicas*

Nas matrizes alimentares, as aminas biogênicas são encontradas, principalmente, em produtos como queijos, carnes curadas, peixes e vinhos. Alimentos fermentados e bebidas tem grande probabilidade de acumular concentrações elevadas de aminas biogênicas e muitos são os fatores que favorecem sua formação nesses produtos. O tipo de alimento, a tecnologia empregada na sua produção e as condições higiênicas que acompanham seu processamento e armazenamento são os principais fatores que influenciam a ocorrência e acumulação das aminas biogênicas (SPANO *et al.*, 2010). As aminas que aparecem com maiores frequências nas matrizes alimentares são histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, espermidina e espermina.

4.2.5.1 Aminas biogênicas em peixes

O conteúdo de ABs em peixes varia muito de acordo com a espécie e origem do peixe e é influenciado pela flora microbiana encontrada em seu ambiente aquático (CHONG *et al.*, 2014; SHAKILA; VIJAYALAKSHMI; JEYASEKARAN, 2003). Antes da etapa de adição de conservantes aos alimentos também pode ocorrer formação de ABs, portanto, mesmo produtos que receberam esses aditivos podem apresentar teores altos de ABs (BILGIN; GENÇCELEP, 2015). A maior parte dos trabalhos sobre determinação de ABs em peixes são realizados em regiões de clima temperado, em comparação com regiões tropicais, e utilizam espécies de peixes como atum, cavalinha, sardinha e anchova (SHAKILA; VIJAYALAKSHMI; JEYASEKARAN, 2003).

Muitos autores observaram SPD e SPM como as aminas predominantes em peixes frescos, uma vez que esses são compostos que desempenham importante papel no crescimento celular (CHONG *et al.*, 2014; VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL-CAROU, 1997). A PUT é a amina que aparece com maior frequência nas amostras de peixe analisadas por diversos autores (BILGIN; GENÇCELEP, 2015; PRESTER, 2011; ZHAI *et al.*, 2012).

Atum, cavala, barrilete e bonito estão entre as espécies onde maiores concentrações de HIM foram observadas, fator atribuído a alta concentração de seu aminoácido precursor, histidina, nos músculos desses peixes, chamados de peixes escombrídeos (PRESTER, 2011; SARKADI, 2009). A HIM é encontrada com pouca frequência em peixes frescos, porém sua concentração tende a aumentar conforme ocorre progresso da deterioração (PRESTER, 2011).

Klausen e Lund (1986) observaram concentrações semelhantes de HIM acumulada durante um período em uma espécie de peixe escombrídeo (cavalinha) e em uma espécie de peixe não escombrídeo (arenque), porém maiores concentrações de CAD foram observadas na cavalinha, concluindo que apesar de haver concentrações semelhantes de HIM entre as duas espécies, os peixes escombrídeos tem uma maior associação com incidentes de intoxicação alimentar, pois a CAD tem capacidade de potencializar os efeitos tóxicos da HIM.

Chong *et al.* (2014) detectaram concentrações consideráveis de ABs após um período de 16 horas em amostras de cavala armazenadas a temperatura ambiente. CAD e HIM começaram a se acumular previamente as outras aminas, após 12 horas

de armazenamento. Com exceção de SPM e SPD todas as ABs apresentaram um aumento de concentração após transcorridas entre 16 e 20 horas de armazenamento. SPM e SPD apresentaram flutuações na concentração durante o período de armazenamento. Após 20 horas armazenadas a 25 °C, a cavala continha uma concentração total de ABs de 1064 mg kg⁻¹. Em amostras de cavala armazenadas a 0 °C foi observado aumento de CAD após 4 dias, de PUT e TIM entre 12 e 14 dias e de SPD após 16 dias, enquanto a SPM não apresentou variação na sua concentração sob esta condição de armazenamento.

Shakila, Vijayalakshmi, e Jeyasekaran (2003) analisaram as concentrações de HIM de peixes das espécies cavala, peixe imperador, robalo, xáreu e barracuda armazenados a temperatura de 32 °C. Após 9 horas teve início a formação de HIM nas espécies cavala, sardinha e barracuda. No xáreu, a HIM começou a ser formada após 12 horas; no robalo, após 15 horas e no peixe imperador, após 18 horas. A maior concentração de HIM após 24 horas foi observada na cavala, com valores acima de 100 mg kg⁻¹.

Veciana-Nogues, Mariné-Font e Vidal-Carou (1997) analisaram as variações das ABs em atum armazenado sob diferentes temperaturas. SPD e SPM foram as aminas predominantes nas amostras de peixe fresco analisadas. DIM permaneceu constante durante o período de armazenamento e apresentou concentrações médias semelhantes nas diferentes temperaturas de armazenamento, com valores de 1,1 mg kg⁻¹ a 0 °C e 1,6 mg kg⁻¹ a 20 °C. A concentração de DIM é influenciada, principalmente, pela atividade enzimática nos músculos do peixe e não pelo crescimento de atividade microbiana (VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL-CAROU, 1997). As concentrações de SPD também permaneceram constantes durante o período analisado, com valor médio de 5,44 mg kg⁻¹. A SPM decresceu de um valor inicial de 14,6 mg kg⁻¹ para 10,2 mg kg⁻¹ após 21 dias a 0 °C, 10,9 mg kg⁻¹ após 9 dias a 8 °C e 12,2 mg kg⁻¹ após 4 dias a 20 °C. FEM foi observada depois de 2 dias em amostras armazenadas a 20 °C e após 7 dias nas amostras armazenadas a 8 °C. O acúmulo de CAD foi maior do que o acúmulo de PUT ao longo do período e foi observada uma diminuição de CAD e PUT depois de 3 dias a 20 °C, quando os peixes já estavam em um grau de deterioração avançado. A HIM foi a amina predominante ao final do período de estudo em todas as temperaturas utilizadas.

Bilgin e Gençlep (2015) analisaram as concentrações de ABs em peixes enlatados, como atum, sardinha, cavala e anchova marinada. Os maiores valores de

HIM, PUT e TIM foram observados no atum enlatado, com concentrações de 110,3; 116,5 e 48,6 mg kg⁻¹, respectivamente, enquanto CAD foi observada em maior concentração na sardinha, com 122,2 mg kg⁻¹.

Estudos realizados com peixes do rio Amazonas apresentaram pacu como a espécie com a maior variedade de ABs, com SPM, SPD, AGM, TIM, PUT e CAD, com uma concentração total de 2,5 mg kg⁻¹, e a sardinha com as menores, com um total de 0,8 mg kg⁻¹ de SPM, SPD e CAD. A presença e concentração das aminas foram influenciadas pelas espécies de peixe, local e época de pesca. Durante a época de chuvas os peixes apresentaram concentrações maiores de aminas. A concentração de tiramina em curimatã indica um risco de intoxicação para pacientes sob tratamento com inibidores de MAO (SOARES *et al.*, 2021).

4.2.5.2 Aminas biogênicas em carnes

Em carnes frescas, SPD e SPM são as principais ABs presentes, outras aminas, principalmente TIM, PUT e CAD, atingem concentrações significativas conforme aumenta a atividade de descarboxilação microbiana dos correspondentes aminoácidos precursores dessas aminas (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2018). Carne vermelha e produtos à base de carne são a principal fonte de exposição na dieta humana à SPM. Informações à respeito das alterações na composição de SPD e SPM durante o armazenamento são inconsistentes, entretanto, geralmente é reportado que ocorre uma diminuição desses compostos com o tempo. Os processamentos empregados na preparação de carnes, como cozimento, defumação ou fermentação influenciam na formação de ABs (JAIRATH *et al.*, 2015; ÖZOGUL; HAMED, 2018).

Nos alimentos processados a base de carne, quantidades consideravelmente mais elevadas de ABs podem ser encontradas, pois os microrganismos utilizados para promover etapas do processamento contribuem para sua formação e acúmulo (JAIRATH *et al.*, 2015; ÖZOGUL; HAMED, 2018). Os estudos de determinação de aminas biogênicas são realizados, principalmente, nos produtos processados, como salsichas (JAIRATH *et al.*, 2015). TIM, CAD, PUT e HIM são as aminas mais comuns encontradas nessa matriz alimentar (LÁZARO *et al.*, 2015).

Sorbato de potássio, ácido ascórbico, nitrito de sódio ou nitrato de sódio são aditivos frequentemente utilizados em produtos cárneos e são relatados na literatura

como retardadores de formação de ABs (NAILA *et al.*, 2010). Esses sais também são usados no processamento dos alimentos com o objetivo de promover a coloração e sabor desejados e retardar a oxidação lipídica (JAIRATH *et al.*, 2015). Os sais de nitrato e nitrito são um dos mais utilizados e no ambiente estomacal podem reagir com as ABs, formando *N*-nitrosaminas, que são compostos carcinogênicos (MEY *et al.*, 2014). Assim, mesmo que a intoxicação por HIM seja menos comum em carnes em comparação com peixes, a presença de AB na carne também é preocupante devido ao potencial para formar nitrosaminas carcinogênicas em produtos onde nitratos e nitritos foram adicionados como conservantes (AL BULUSHI *et al.*, 2009; SPANO *et al.*, 2010).

ABs foram determinadas em diferentes tipos de carne com os valores mais altos para HIM, TIM e CAD de 200, 320 e 790 mg kg⁻¹, respectivamente (JAIRATH *et al.*, 2015). As principais ABs encontradas em carne branca de frango e carne vermelha bovina foram TIM e CAD, com valores de TIM alcançando 230 mg kg⁻¹ (FEDDERN *et al.*, 2019; VINCI; ANTONELLI, 2002). Salsichas a base de carne de peru, cavalo e boi tiveram concentrações totais de ABs de 730, 130 e 500 mg kg⁻¹, respectivamente (LORENZO; MUNEKATA; DOMÍNGUEZ, 2017). Em carnes frescas, SPM foi detectada com concentrações de 27 mg kg⁻¹ em carne bovina e 67 mg kg⁻¹ em carne suína, enquanto outras aminas não foram detectadas ou tiveram concentrações menores do que 10 mg kg⁻¹ (JAIRATH *et al.*, 2015).

4.2.5.3 Aminas biogênicas em alimentos destinados à animais

A indústria de alimentos destinados a animais domésticos utiliza tradicionalmente uma grande variedade de fontes de proteínas, que incluem carnes, ossos, produtos derivados de aves de capoeira e produtos de soja (FAHEY JR, 2004). Muitos dos ingredientes utilizados na fabricação desses alimentos são classificados como subprodutos animais e demandam uma grande quantidade de processamento antes de serem adicionados aos produtos destinados para alimentação animal (FOLADOR *et al.*, 2006). O manuseamento e armazenamento incorreto desses produtos em diferentes etapas de seu processamento ou antecedentes a ele podem levar a formação de aminas biogênicas.

Durante o abate de animais são produzidos diversos subprodutos que não são adequados para a alimentação humana pois contém uma quantidade elevada

de microrganismos. Esses subprodutos representam um potencial risco à saúde de animais alimentados por eles, e também de humanos que consumirem esses animais, e devem passar por um processamento adequado para que sejam considerados seguros para a alimentação animal. Usualmente os subprodutos são preservados por meio de fermentação com bactérias ácido lácticas. Esse processo é realizado com adição aos subprodutos de quantidades suficientes de carboidratos, redução da pressão e rápida multiplicação das culturas de iniciação, promovendo suficiente produção de ácido láctico. A silagem produzida por esse processo é um produto comum utilizado na alimentação destinada a animais de estimação e porcos, por meio da mistura de peixes, subprodutos carnívoros, carboidratos e culturas microbianas de iniciação (URLINGS; BIJKER; VAN LOGTESTIJN, 1993).

No processo de industrialização de produtos de pesca ocorre muito desperdício de alimentos, que por serem ricos em proteínas e lipídios podem ser utilizados para nutrição humana e animal. Muitos subprodutos de pesca e de processamento de frutos do mar são transformados em silagem de peixe, por meio de fermentação com culturas bacterianas e uma fonte de carboidratos ou por ácidos orgânicos e inorgânicos, e destinados para produção de alimentação animal (ÖZYURT *et al.*, 2016). O baixo pH e as condições físicas da silagem de peixe, como quantidades consideráveis de aminoácidos livres e enzimas descarboxilases bacterianas, levam a uma baixa concentração de oxigênio dentro do peixe e proporcionam um ambiente favorável a acumulação de aminas biogênicas (DAPKEVICIUS *et al.*, 2000). Özyurt e colaboradores (2016) compararam as concentrações de ABs em peixes crus e na silagem produzida por eles após um período de armazenamento de 60 dias. Em silagens produzidas por fermentação foi observado um aumento nas concentrações de CAD e PUT, que atingiram 102,2 e 181,3 mg kg⁻¹. TIM apresentou um aumento nas silagens produzidas por fermentação e por acidificação, mas o aumento na silagem fermentada foi maior, atingindo 355,3 mg kg⁻¹ na primeira e 102,7 mg kg⁻¹ na segunda.

HIM, PUT e CAD foram medidas em subprodutos de aves domésticas, que foram misturados com 10 % de açúcar de beterraba, 0-2 % de dextrose e inoculados com *L. plantarum* e *E. faecium*, depois de 21 dias do início da fermentação mantida em 15 °C. Observou-se que a concentração das ABs apresentou grande aumento após a fermentação e que a adição de dextrose 2 % reduziu as quantidades de aminas, porém os níveis continuaram elevados, sendo os maiores valores

observados quando o meio foi inoculado com bactéria, correspondendo à 53, 435 e 622 mg kg⁻¹ para HIM, CAD e PUT, respectivamente (URLINGS; BIJKER; VAN LOGTESTIJN, 1993).

4.2.6 Limites regulatórios de aminas em alimentos

Como ainda existem poucas informações a respeito dos efeitos toxicológicos das ABs na saúde humana e esses efeitos dependem de mecanismos de desintoxicação individuais e da presença de compostos moduladores, é difícil estabelecer limites legais para as concentrações de aminas permitidas nos alimentos. A HIM, por ser mais reconhecida em casos de intoxicação alimentar, é a única dentre elas que tem um limite regulatório estabelecido para consumo humano, porém esse limite varia de acordo com o país e legislação adotada. A *Food and Drugs Administration* (FDA) estabelece os limites de HIM em peixes escombrídeos em 50 mg kg⁻¹, já a Comunidade Européia, o Canadá e o Brasil aceitam valores de até 100 mg kg⁻¹ para peixes dessa categoria. Na Austrália, os valores admitidos são de até 200 mg kg⁻¹ e a China permite valores entre 200 e 400 mg kg⁻¹. Alguns países também sugerem limites para a presença de HIM em bebidas alcoólicas, sendo esse valor de 2 mg L⁻¹ na Alemanha, 3,5 mg L⁻¹ na Holanda, 8 mg L⁻¹ na França e 10 mg L⁻¹ na Suíça e na Austrália (ZHANG Y. *et al.*, 2019).

Para as demais aminas, apesar de não existirem legislações específicas, recomenda-se que a concentração de TIM esteja entre valores de 100 e 800 mg kg⁻¹, de FEM até 30 mg kg⁻¹ e que a concentração de aminas totais nos alimentos não exceda 1000 mg kg⁻¹ e esteja abaixo de 40 mg por refeição (BILGIN; GENÇCELEP, 2015; TEN BRINK *et al.*, 1988). No entanto, valores de 3 mg de TIM e FEM já foram reportados como possíveis de causar efeitos adversos em indivíduos mais suscetíveis (BILGIN; GENÇCELEP, 2015; TEN BRINK *et al.*, 1988).

O Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis (NOAEL, do inglês *No Observed Adverse Effect Level*) para a histamina é de 25 a 50 mg por pessoa por refeição, e para a tiramina é de 600 mg por pessoa por refeição para indivíduos quem não faz uso de medicamentos inibidores de MAO e de 50 mg para os indivíduos que fazem uso desses medicamentos (EFSA, 2011).

4.2.7 Aminas biogênicas como indicadores de qualidade alimentar

A maioria dos alimentos ricos em proteínas e aminoácidos, quando submetidos a condições sanitárias inadequadas apresentam um aumento da atividade microbiana e, se esses microrganismos possuírem enzimas descarboxilases, ocorrerá também um aumento na concentração de aminas biogênicas. Dessa forma, as aminas podem ser empregadas como parâmetro ou critério de qualidade, refletindo a qualidade da matéria-prima utilizada e das condições higiênicas prevalentes durante a produção, processamento e armazenamento do alimento (BILGIN; GENÇCELEP, 2015; JAIRATH *et al.*, 2015). Uma vantagem na utilização de aminas como critério de qualidade reside no fato destas serem termoresistentes, permanecendo no alimento mesmo após tratamento térmico. No entanto, não existe um forma simples de estabelecer um índice ideal para a avaliação da qualidade do alimento através da concentração das aminas, uma vez que são muitos os fatores que influenciam na sua formação.

Diversos índices para aminas biogênicas (IAB) são sugeridos por alguns autores considerando a concentração de determinadas ABs em diferentes matrizes alimentares, conforme descrito no Quadro 2. Entre eles, os mais utilizados na literatura são os índices sugeridos por Mietz e Karmas (1977) e por Veciana-Nogues, Mariné-Font e Vidal-Carou (1997).

O índice para ABs de Mietz e Karmas (IAB_{MK}) é baseado no aumento de histamina (HIM), cadaverina (CAD) e putrescina (PUT) e na diminuição de espermidina (SPD) e espermina (SPM), calculadas em mg kg^{-1} , de acordo com a equação 5.

$$IAB_{MK} = \frac{CAD+PUT+HIM}{1+SPD+SPM} \quad (5)$$

Valores de IAB_{MK} abaixo de 1 indicam boa qualidade do alimento, valores entre 1 e 10 indicam que o alimento está no limite de qualidade e valores acima de 10 indicam alimentos de baixa qualidade e contaminados (SARKADI, 2009).

O índice para ABs proposto por Veciana-Nogues, Mariné-Font e Vidal-Carou (IAB_{VN}) não considera as concentrações de SPD e SPM para a avaliação da

qualidade do alimento, mas leva em consideração a concentração de tiramina (TIM), de acordo com a equação 6.

$$IAB_{VN} = CAD + PUT + HIM + TIM \quad (6)$$

Na somatória das concentrações calculadas no IAB_{VN} , em mg kg^{-1} , valores abaixo de 5 mg kg^{-1} indicam boa qualidade do alimento, valores entre 5 e 20 mg kg^{-1} são considerados aceitáveis, mas indicam uma deterioração inicial no alimento, entre 20 e 50 mg kg^{-1} são sinais de alimentos de baixa qualidade e valores acima de 50 mg kg^{-1} indicam alimentos estragados e não adequados para o consumo.

Quadro 2 – Índices de aminas biogênicas sugeridos por diversos autores

Produtos	Aminas biogênicas (mg kg^{-1})	Referência
carne de vaca fresca	TIM e CAD	(GALGANO <i>et al.</i> , 2009)
peixe	CAD + PUT + HIM + TIM	(VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL-CAROU, 1997)
carne de porco	PUT + CAD + HIM + TIM	(HERNÁNDEZ-JOVER <i>et al.</i> , 1997)
carne de peru	CAD ou PUT + HIM + TIM	(FRAQUEZA; ALFAIA; BARRETO, 2012)
carne de frango	TIM + CAD	(ROKKA <i>et al.</i> , 2004)
peixe	$\frac{CAD + PUT + HIM}{1 + SPD + SPM}$	(MIETZ; KARMAS, 1977)
carne moída crua	TIM e PUT	(SAYEM-EL-DAHER <i>et al.</i> , 1984)

Fonte: Elaborado pela Autora (2021).

4.2.8 Formas de prevenir a formação de aminas biogênicas nos alimentos

Para que ABs sejam formadas nos alimentos é necessário que haja disponibilidade de aminoácidos precursores, bactérias que sintetizem amino oxidades e condições favoráveis ao seu crescimento e atividade de descarboxilação (TABANELLI; MONTANARI; GARDINI, 2019). O tipo de amina formada no alimento e sua concentração são influenciados pelo pH, conteúdo de água, composição e microbiota do alimento e também pelas condições de tempo e temperatura de armazenamento a que ele é submetido, que se empregadas de forma incorreta favorecem o crescimento microbiano (SARKADI, 2009). Algumas formas de prevenir a formação de ABs são limitar ou evitar operações durante a produção do alimento que levem a um aumento dos substratos ou a condições favoráveis ao crescimento

dos microrganismos, empregando práticas higiênicas adequadas durante a produção e armazenamento do alimento. Medidas importantes incluem o monitoramento da concentração de ABs na matéria-prima utilizada e em toda a cadeia alimentar, assim como o monitoramento da presença de microrganismos com atividade descarboxilase em diferentes estágios da produção do alimento, inclusive no produto final. Esse monitoramento permite avaliar os fatores que mais contribuem para a formação e acumulação das aminas e auxilia na elaboração das técnicas de correção que devem ser empregadas (ALVAREZ; MORENO-ARRIBAS, 2014; TABANELLI; MONTANARI; GARDINI, 2019).

Medidas que estão sendo aplicadas para controlar a formação de aminas em produtos derivados de peixes e carnes consistem em manter a temperatura abaixo de 5° C, adicionar aditivos e conservantes ao alimento, aplicar pressões hidrostáticas e irradiação e alterar as condições de processamento baseando-se na atividade da bactéria produtora de histamina. Esses métodos inibem a bactéria ou a atividade da enzima descarboxilase e fazem com que a formação de aminas biogênicas ocorra mais tardiamente. Em alimentos fermentados, outra forma de prevenir a formação de ABs é utilizar como cultura de iniciação microrganismos que não tenham atividade descarboxilase de aminoácidos e, dessa forma, não sejam aptos a produzir aminas (GARDINI *et al.* 2016).

O uso de bactérias ácido lácticas que degradam ABs na produção de alimentos fermentados também tem sido proposto como uma alternativa para controlar o acúmulo desses compostos. A atividade dessas bactérias é máxima sob condições neutras e alcalinas e é dependente da disponibilidade de oxigênio. Durante os primeiros dias de armazenamento, quando o pH está suficientemente alto e ainda há disponibilidade de oxigênio dentro do produto, sua utilização fornece um meio de controlar a acumulação de histamina (DAPKEVICIUS *et al.*, 2000).

4.2.9 Métodos de análise de aminas

A motivação experimental em estudar ABs está relacionada ao papel que elas desempenham como marcadores químicos de deterioração de alimentos e ao potencial risco que representam para a saúde humana (ÖNAL; TEKKELI; ÖNAL, 2013). A análise de ABs em alimentos apresenta algumas dificuldades devido às baixas concentrações em que se encontram, à complexidade da matriz, à alta

polaridade dos compostos, o que os torna mais solúveis em água do que nos solventes orgânicos, a ausência de grupos cromóforos nesses compostos e à ocorrência de várias aminas simultaneamente na amostra. A determinação analítica, portanto, deve ser realizada por uma técnica apropriada e de sensível detecção (MOHAMMED *et al.*, 2016). A análise desses compostos requer etapas de pré-tratamento da amostra, que envolve a extração das aminas da matriz alimentar e sua concentração em níveis adequados que permitam a determinação analítica (JAIN; VERMA, 2018). Os limites de detecção das técnicas empregadas na determinação de aminas biogênicas geralmente estão nos níveis de ppm (ERIM, 2013).

Os principais métodos analíticos para determinação das aminas biogênicas incluem técnicas cromatográficas como cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar (CE) e sensores desenvolvidos para essa finalidade (ERIM, 2013; JAIN; VERMA, 2018; MOHAMMED *et al.*, 2016; ÖNAL; TEKKEI; ÖNAL, 2013). A Comissão de Regulação Européia estabelece o HPLC como técnica de referência para determinação de HIM em peixes e produtos pesqueiros, porém o desenvolvimento de novos métodos de extração e análise ou a modificação dos já existentes constituem os principais desafios analíticos para encontrar um método que permita, de forma confiável, controlar a qualidade dos alimentos e a eficiência dos processos tecnológicos que visam diminuir a formação de aminas biogênicas nos alimentos.

4.2.9.1 Extração e derivatização

A extração das aminas das matrizes alimentares é uma etapa importante do pré-tratamento da amostra, pois irá influenciar diretamente nos parâmetros analíticos do método desenvolvido, como precisão, exatidão, repetibilidade e recuperação. Métodos comuns de extração incluem extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME) e microextração em fase líquida (LPME), como já descritos na seção 2.1.

Ácidos são os principais solventes utilizados para a extração das aminas da matriz sólida e a escolha do ácido depende das características da matriz trabalhada. Amostras sólidas são mais comumente extraídas com solventes como ácido

perclórico (PCA), ácido tricloroacético (TCA), ácido metanossulfônico (MSA) e ácido clorídrico (HCl). Solventes orgânicos são utilizados para a extração das aminas da solução ácida e para promover sua concentração, entre eles etanol, metanol, clorofórmio, acetona e acetonitrila já foram reportados na literatura como solventes de extração (MOHAMMED *et al.*, 2016).

Os detectores de absorbância na região do ultravioleta (UV) ou de fluorescência (FL) são os mais utilizados para a determinação analítica das aminas biogênicas, porém as aminas não possuem um grupo cromóforo e, portanto, possuem baixa absorção natural no visível ou ultravioleta e não apresentam propriedades fluorescentes. Uma derivatização química deve ser realizada previamente ou posteriormente a passagem da amostra pela coluna cromatográfica para aumentar sua sensibilidade e seletividade e torná-las detectáveis por essas técnicas (ÖNAL; TEKKELI; ÖNAL, 2013). A derivatização pré-coluna também tem como característica diminuir a polaridade das aminas e aumentar a resolução do pico cromatográfico. Os derivatizantes variam na sua estrutura e mecanismo de reação (JAIN; VERMA, 2018), conforme representado na Figura 6. Alguns agentes derivatizantes incluem cloreto de 5-dimetilaminonaftalenosulfonila (cloreto de dansila), cloreto de 4-dimetilaminoazobenzeno-4-sulfonila (cloreto de dabsila), cloreto de benzoíla, cloroformiato de isobutila e *o*-ftalaldeído (OPA).

O reagente mais utilizado para derivatização de ABs é o cloreto de dansila (DNS-Cl) e já foi reportado para análise de muitas amostras, como carnes, peixes, cervejas e vinhos. O grupo reativo é o cloreto de sulfonila, que reage com aminas primárias e secundárias e fornece derivatizados estáveis de sulfonamida, melhorando assim as propriedades cromatográficas. Esse derivatizante é compatível com detectores UV, fluorescência e espectrômetro de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*). Na região do UV os produtos derivatizados são detectados em torno de 250 nm. Algumas desvantagens relacionadas à esse reagente são o longo período de reação, de 10 a 40 minutos, e altas temperaturas, de 25 à 70 °C, empregas para a reação. Além disso, o DNS-Cl não é específico apenas para aminas, podendo reagir também com alcóis e fenóis (JAIN; VERMA, 2018).

O cloreto de dabsila (DBS-Cl) é outro reagente com grupo reativo de cloreto de sulfonila que pode reagir com aminas primárias e secundárias. Os derivatizados formados são estáveis e podem ser detectados em 446 nm. Essa reação é sensível

ao pH e deve ser realizada em pH igual a 8,2. Altas temperaturas e longos períodos de reação também são associados a esse reagente (JAIN; VERMA, 2018).

OPA comparado com outros derivatizantes reage rapidamente com as aminas, porém apenas com aminas primárias e fornece derivatizados instáveis, e sua utilização também implica que a coluna cromatográfica seja resistente a meios alcalinos (ERIM, 2013). As determinações dos derivatizados de OPA devem ser feitas por fluorescência, com excitação (λ_{ex}) em 330 nm e emissão (λ_{em}) em 445 nm.

Cloreto de benzoíla também é um reagente amplamente utilizado na determinação de ABs. Ele reage com aminas primárias e secundárias, forma produtos estáveis, é mais barato do que outros reagentes de derivatização e as reações são rápidas, cerca de 10 minutos. Os derivatizados podem ser detectados por UV, porém maiores sensibilidades são observadas com detector de espectrômetro de massas. Uma desvantagem é que ele também reage com diversos outros compostos, como íons amônio, aminoácidos, açúcares, álcoois, polipeptídeos e polifenóis que coexistem na matriz (JAIN; VERMA, 2018).

Cloroformiato de isobutila reage com aminas primárias e secundárias, é barato e fácil para se trabalhar, as reações podem ser realizadas rapidamente e não exigem condições específicas. Entretanto, não apresenta absorbância na região UV ou fluorescência e sua utilização é indicada quando o detector disponível é um espectrômetro de massas (JAIN; VERMA, 2018).

Um método direto de preparo de amostra baseado em uma extração líquida assistida por *salting-out* (SALLE) e derivatização com DNS-Cl tem sido estudado para determinação de ABs em algumas matrizes. SALLE foi utilizada para extração de TIM, PUT, TRY, FEM, MET e SPD em sucos de fruta e bebidas alcoólicas. Utilizando $MgSO_4$ como sal, 1-naftilisotiocianato como reagente de derivatização e acetonitrila como solvente para determinação analítica por HPLC-UV. As recuperações obtidas ficaram entre 93 e 110 % (JAIN; GUPTA; VERMA, 2015). SALLE também foi usada para determinar MET, ETI, DIM, FEM, PUT, CAD, HIM, TIM, SPD e SPM em queijos com derivatização com DNS-Cl, utilizando NaCl como eletrólito para promover o efeito *salting-out* e acetonitrila como solvente de extração. A detecção foi realizada por HPLC-FL, os limites de detecção ficaram entre 0,015 mg L⁻¹ (SPM) e 1,77 mg L⁻¹ (HIM) e as taxas de recuperação entre 81 % e 116 % (RAMOS; BRANDÃO; RODRIGUES, 2020). Um procedimento semelhante forneceu

resultados satisfatórios para extração de ABs em vinho após derivatização por 25 minutos (RAMOS; VALENTE; RODRIGUES, 2014).

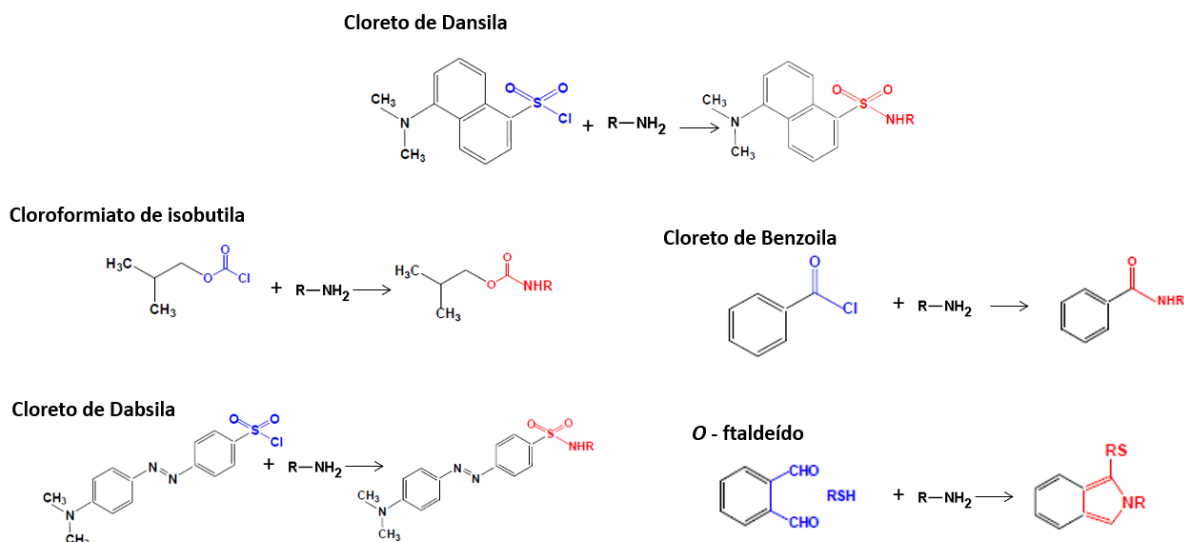


Figura 6 – Reagentes de derivatização de aminas biogênicas mais utilizados
Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

4.2.9.2 Técnicas instrumentais para determinação de aminas biogênicas

A técnica de análise mais usual para determinação de ABs é HPLC em fase reversa com detetor de absorvância UV, fluorescência (FL) ou espectrômetro de massas (MS) (ERIM, 2013; MOHAMMED *et al.*, 2016; ÖNAL; TEKKELI; ÖNAL, 2013). No Quadro 3 estão listados alguns trabalhos que utilizaram HPLC como técnica instrumental para análise de aminas biogênicas em peixes e os detectores e reagentes empregados pelos autores para extração e derivatização das amostras.

Eletroforese capilar também é uma técnica reportada para separação e análise de aminas biogênicas. Ela permite analisar uma grande variedade de compostos com baixos níveis de concentração com o mínimo de pré-tratamento da amostra (ERIM, 2013). Apresenta como principais vantagens a rapidez, alta eficiência de separação, baixo consumo de amostra e de solventes e colunas de separação mais baratas do que as utilizadas para HPLC. Entretanto, a sensibilidade da eletroforese é menor do que na análise por HPLC. A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica pouco utilizada para determinação de ABs em comparação com HPLC e eletroforese devido à baixa volatilidade dessas aminas (MOHAMMED *et al.*, 2016). Para análises por GC a principal modificação que o agente de derivatização

deve promover é aumentar a volatilidade das aminas. Espectrômetro de massas é o principal detector associado à separações por GC (MUNIR; BADRI, 2020).

Sensores químicos têm sido desenvolvidos para a determinação de ABs como uma alternativa aos instrumentos caros utilizados nas técnicas cromatográficas. Os biossensores consistem em uma combinação de diferentes enzimas que permitem o bio-reconhecimento das aminas biogênicas. Os transdutores de sinal mais comuns para a construção de biossensores para ABs são sensores eletroquímicos. Os sensores desenvolvidos geralmente são baseados em uma respostas de fluorescência promovida pela interação de ABs com as moléculas do sensor (ERIM, 2013).

Quadro 3 – Análise de aminas biogênicas por HPLC

Tratamento da amostra	Reagente de derivatização	Fase estacionária Fase móvel (A) e (B)	Detector	Analitos	Referência
TCA 5 % (v/v)	DNS-Cl	coluna C18 A: Acetato de amônio B: Acetonitrila	Fluorescência $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 350/520 nm	FEN, CAD, PUT, HIS, TIR, TRI, SPD, SPM	(ZHAI <i>et al.</i> , 2012)
HClO ₄ (0,4 mol L ⁻¹)	DNS-Cl	coluna C18 A: Acetato de amônio B: Acetonitrila	UV 254 nm	FEN, CAD, PUT, HIS, TIR, TRI, SPD, SPM	(KÖSE <i>et al.</i> , 2012)
HClO ₄ (0,4 mol L ⁻¹)	DNS-Cl	coluna C18 A: Acetato de amônio B: Acetonitrila	UV 254 nm	AGM, FEN, CAD, PUT, HIS, TIR, TRI, SPD, SPM	(ŠIMAT; DALGAARD, 2011)
TCA (75 g L ⁻¹)	OPA	coluna C18 A: Acetato de sódio/sulfonato octano B: Acetonitrila	Fluorescência $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 354/430 nm	AGM, FEN, CAD, PUT, HIS, TIR, TRI, SPD, SPM	(ŠIMAT; DALGAARD, 2011)
TCA 5 % (v/v) SPE	-	coluna C18 A: formiato de amônio/ácido fórmico B: Metanol	MS/MS	FEN, CAD, PUT, HIS, TIR, TRI, SPD, SPM	(SAGRATINI <i>et al.</i> , 2012)
HClO ₄ (0,6 mol L ⁻¹)	-	UHPLC, BEH coluna C18 A: Metanol B: Ácido fórmico	MS/MS	CAD, PUT, HIS, TIR	(ROMERO-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2012)
TCA 6 % (v/v)	DBS-Cl	coluna C18, A: Acetonitrila B: Água Ultrapura	UV 254 nm	CAD, PUT, HIS, SPD, SPM	(CHONG <i>et al.</i> , 2014)
HClO ₄ (0,4 mol L ⁻¹)	OPA	coluna C18 A: Acetonitrila B: Água Ultrapura	Fluorescência $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 350/444 nm	HIS	(SHAKILA; VIJAYALAKSHMI; JEYASEKARAN, 2003)
HClO ₄ (0,4 mol L ⁻¹)	OPA	coluna C18 A: Acetonitrila B: Água Ultrapura	Fluorescência $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 350/444 nm	AGM, FEN, CAD, PUT, HIS, TIR, TRI, SPD, SPM	(VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL- CAROU, 1997)
HClO ₄ (0,4 mol L ⁻¹)	DNS-Cl	coluna C18 A: Acetato de amônio (0,1 mol L ⁻¹) B: Acetonitrila	UV 254 nm	CAD, PUT, HIS, TIR, TRI	(BILGIN; GENÇCELEP, 2015)
TCA 5 % (v/v)	DNS-Cl	coluna C18 A: Água ultrapura B: Acetonitrila	UV 254 nm	CAD, PUT, HIS, TIR, TRI, SPD, SPM	(HU <i>et al.</i> , 2012)

Tratamento da amostra	Reagente de derivatização	Fase estacionária Fase móvel (A) e (B)	Detector	Analitos	Referência
-	Dietil etóximetenomalonato	coluna C18 A: Tampão de acetato e azida de sódio B: Acetonitrila e metanol	DAD 269, 280 e 300 nm	CAD, HIS, SPD, TIR, 2-FEN, PUT, TRI	(POVEDA, 2019)
HClO ₄ (0,4 mol L ⁻¹)	DNS-Cl	coluna C18 A: Acetonitrila B: Água Ultrapura	UV 254 nm	CAD, HIS, TRI, PUT, 2-FEN, SPD, SPM, TIR	(KIM; LEE; HUR, 2019)
-	DBS-Cl	coluna C18 A: Tetraborato de sódio B: Metanol	DAD 200-600 nm	ETI, CAD, PUT, HIS, 2-FEN, SPD, SPD, TRI	(MILHEIRO <i>et al.</i> 2019)
TCA 5 % (v/v)	OPA	coluna C18 A: Acetato de sódio e ocatanosulfonato de sódio B: Acetonitrila	Fluorescência $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 340/450 nm	CAD, HIS, TRI, PUT, 2-FEN, SPD, SPM, TIR, AGM, SER	(SOARES <i>et al.</i> , 2021)
-	-	coluna C18 A: Água Ultrapura B: Metanol	MS/MS	CAD, HIS, PUT, SPD, SPM, TIR	(BERTUZZI <i>et al.</i> , 2020)
HClO ₄ 5 % (v/v)	DBS-Cl	coluna C18 A: Acetonitrila B: Água Ultrapura	UV 198 nm	CAD, PUT, SPD, SPM, TIR	(LÁZARO <i>et al.</i> , 2013)

Fonte: Elaborado pela Autora (2022).

4.3 Objetivos

- Otimizar e validar os parâmetros analíticos da extração por SALLE para determinação de aminas biogênicas em alimentos
- Avaliar a eficiência de aplicação da técnica de extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE) para determinação de aminas biogênicas em produtos alimentares de origem animal
- Extrair e isolar as principais aminas biogênicas presentes em peixes, carnes e produtos derivados utilizando a técnica SALLE
- Identificar e quantificar as aminas biogênicas presentes nos alimentos após extração por SALLE por HPLC
- Aplicar a influência da temperatura e do tempo de armazenamento na formação de aminas biogênicas nos alimentos
- Comparar a concentração de aminas biogênicas observada em diferentes produtos alimentares e avaliar as influências da natureza do alimento e do processamento aplicado na sua produção para a formação de aminas biogênicas.

4.4 Parte experimental

Nessa seção são descritos os reagentes e procedimentos realizados para determinação de aminas biogênicas em produtos alimentícios com a aplicação da técnica de SALLE.

4.4.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau analítico. Água deionizada (ultrapura) com resistividade mínima de 18,2 MΩ cm (Direct-Q sistema de purificação de água 3UV) foi utilizada para o preparo de todas as soluções. Reagentes de grau analítico de hidrocloreto de metilamina, hidrocloreto de etilamina, hidrocloreto de dimetilamina, hidrocloreto de 2-feniletilamina, hidrocloreto de isopentilamina, di-hidrocloreto de putrescina, di-hidrocloreto de cadaverina, di-hidrocloreto de histamina, hidrocloreto de tiramina, tri-hidrocloreto de espermidina e

tetra-hidrocloreto de espermina foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Cloreto de sódio, acetato de amônio e cloreto de dansila (DNS-Cl) também foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Acetonitrila e ácido clorídrico foram adquiridos da Fisher. Ácido acético e ácido sulfanílico foram obtidos da Merck. Hidróxido de sódio foi adquirido da PanReac AppliChem, carbonato de sódio da Neon e nitrato de sódio da Synth.

Soluções estoque de cada amina biogênica foram preparadas em concentrações de 1000 mg L⁻¹ por dissolução de quantidades apropriadas dos reagentes comerciais em HCl 0,1 mol L⁻¹ e armazenadas à 4 °C. As soluções de trabalho utilizadas para a curva de calibração foram preparadas por diluição das soluções estoque em HCl 0,1 mol L⁻¹ para concentrações de 1,0 a 50,0 mg L⁻¹ para metilamina, etilamina, feniletilamina, isopentilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, dimetilamina, espermidina e espermina.

A solução tampão de acetato de amônio 0,01 mol L⁻¹ (pH 4), utilizado como fase móvel no HPLC, foi preparada por dissolução de quantidades apropriadas de ácido acético glacial e acetato de amônio em água ultrapura.

O reagente de derivatização utilizado foi o cloreto de dansila (DNS-Cl) preparado em concentrações de 2,5 g L⁻¹ por dissolução em acetonitrila.

4.4.2 Amostras

Para os ensaios analíticos foram utilizadas amostras de atum em conserva com água, atum em conserva com azeite, sardinha em conserva com óleo, sardinha fresca, salsicha de peru, salsicha de frango e salsicha de porco, carne bovina (vitela) e produtos à base de peixe e carne destinados à alimentação de animais domésticos. As amostras foram adquiridas entre novembro de 2017 e junho de 2018 e em janeiro de 2021 em supermercados. Após abertas, as amostras foram trituradas em um processador de alimentos para homogeneizá-las. Nos ensaios de otimização de etapas do método, as amostras foram utilizadas logo após serem abertas e homogeneizadas.

Foram realizados ensaios de degradação sob condições extremas. Nesses ensaios, após abertas e homogeneizadas, cada amostra foi dividida em 3 grupos e cada um deles armazenados à - 4 °C (*freezer*), 4 °C (geladeira) e 22 °C (sob a bancada do laboratório) até o momento das análises, que foram realizadas com

intervalos de 8 horas, 1 dia, 4 dias, 6 dias e 7 dias, contados a partir da abertura da amostra. Cada análise foi realizada em triplicata.

4.4.3 Procedimento de extração e derivatização

O procedimento de extração foi realizado conforme descrito por Ramos (2014) com apropriadas modificações. Para esse procedimento, 2,0 g de amostra foram pesados em tubo Falcon de 50,0 mL, homogeneizados com 10,0 mL de HCl 1 mol L⁻¹ e centrifugados por 20 minutos à 7750 x g (4000 rpm). Em seguida, 2,0 mL do sobrenadante foram transferidos para um tubo Falcon de 15,0 mL, onde foram adicionados 2,0 mL de DNS-Cl (2,5 g L⁻¹) preparado em acetonitrila, para obter uma razão de 1:1 (v/v) entre as fases aquosa e orgânica, 0,80 mL de NaOH 6 mol L⁻¹ e 0,13 g de NaCl. Os tubos contendo esses reagentes foram centrifugados à 7750 x g por 1 minuto e a seguir deixados no escuro por 5 minutos para que a derivatização se completasse. Formaram-se duas fases distintas na solução e a fase superior foi coletada para ser analisada por HPLC. O procedimento experimental está representado na Figura 7. A Figura 8 mostra uma representação da reação entre DNS-Cl e aminas.

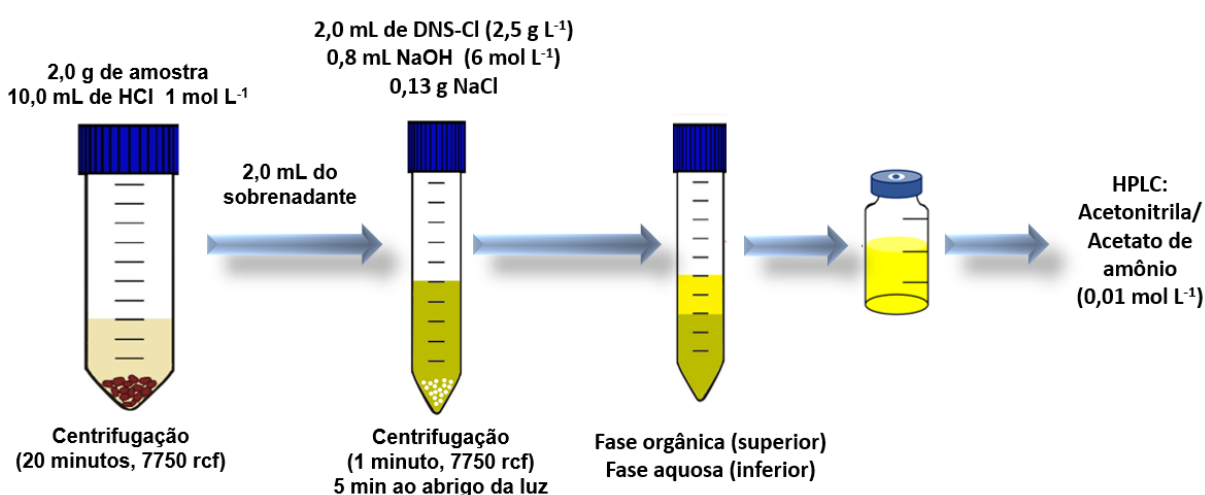


Figura 7 – Representação esquemática do procedimento experimental proposto para extração de aminas biogênicas

Fonte: Elaborada pela Autora (2018).

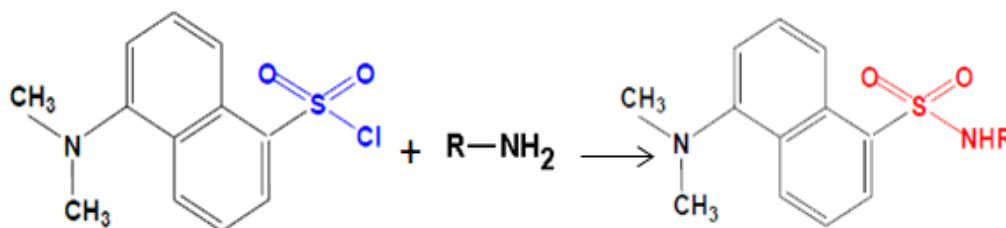


Figura 8 – Representação da reação de cloreto de dansila (DNS-Cl) com aminas

Fonte: Elaborada pela Autora (2019).

Otimizações de tempo de reação de derivatização, tempo de centrifugação, concentrações de DNS-Cl e NaOH foram realizadas em trabalhos anteriores e aplicadas com apropriadas modificações (RAMOS; BRANDÃO; RODRIGUES, 2020).

4.4.4 Análise por HPLC

A separação e quantificação dos derivatizados de aminas biogênicas foi realizada por sistema HPLC (Jasco Corporation, Japão) composto por detectores ultravioleta (UV) e de fluorescência (FL). Para a análise foram utilizadas coluna *Phenomenex Gemini C₁₈* (150 mm x 4,60 mm, partículas com 3 µm de tamanho), coluna guarda com as mesmas características e fase móvel constituída por acetonitrila e acetato de amônio 0,01 mol L⁻¹ em modo de eluição gradiente. A fase móvel iniciou-se com composição de 40 % de acetonitrila, nos primeiros 35 minutos a acetonitrila aumentou de 40 para 70 %, nos 5 minutos seguintes chegou a 100 % e permaneceu com essa composição até 50 minutos, de 50 a 55 minutos retorna a 40 % e por mais 5 minutos permaneceu sob essa condição para que a coluna fosse condicionada para a próxima análise. O fluxo foi mantido em 0,5 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 20 µL. A detecção dos derivatizados no UV foi realizada em comprimento de onda de 254 nm e na fluorescência o comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) foi de 320 nm e o comprimento de onda de emissão foi (λ_{em}) 523 nm.

4.4.5 Ensaios colorimétricos para determinação de histamina

Para esse ensaio, primeiramente foi preparado o reagente sulfonato de *p*-fenildiazônio com 1,5 mL de uma solução de ácido sulfanílico 0,9 % (m/v) em ácido clorídrico 4 % (v/v) e 1,5 mL de uma solução de NaNO₂ 5 % (m/v), essa solução foi

mantida em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, 6,0 mL da solução de NaNO_2 5 % (m/v) foram adicionados e após mais 5 minutos em banho de gelo a solução foi completada com água destilada até volume final de 50,0 mL. O reagente pode ser utilizado para as reações após 15 minutos e permanece estável por até 12 horas.

À um béquer, foram adicionados 5,0 mL de uma solução de Na_2CO_3 1,1 % (m/v), 2,0 mL do reagente sulfonato de *p*-fenildiazônio e 1,0 mL de alíquotas de solução padrão de histamina ou do extrato obtido. A absorbância da solução foi determinada após 5 minutos em espectrofotômetro no comprimento de onda de 496 nm.

Para a construção da curva de calibração e da curva com adição de padrão, foram adicionadas alíquotas de histamina com concentrações de 0, 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0 e 100,0 mg L^{-1} .

4.4.5.1 Ensaio colorimétrico para determinação de histamina nas amostras de peixe

Para a construção da curva com adição de padrão e para a determinação de histamina em amostras de peixe, primeiramente 1,0 g da amostra foi pesado em um tubo Falcon. Em seguida, foram adicionados 10,0 mL de HCL 1,0 mol L^{-1} , no caso da determinação nas amostras. Para a curva com adição de padrão, alíquotas de solução padrão de histamina com concentrações de 0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0 e 100,0 mg L^{-1} foram adicionadas e o volume é completado até 10,0 mL com HCL 1,0 mol L^{-1} . As soluções foram centrifugadas por 20 minutos à 2300 x g (4000 rpm). Do sobrenadante obtido, uma alíquota de 2,0 mL foi transferida para outro tubo Falcon, onde foi realizada uma extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE) com a adição de 2,0 mL de acetonitrila, 0,13 g de NaCl e 0,8 mL de NaOH 6 mol L^{-1} . Essa solução foi centrifugada à 2300 x g (4000 rpm) por 1 minuto. Do novo sobrenadante formado por essa centrifugação, uma alíquota de 1,0 mL foi retirada e adicionada ao reagente de sulfonato de *p*-fenildiazônio para realizar a reação colorimétrica, conforme descrita no item 4.4.5.

4.5 Resultados e Discussão

A análise dos resultados dos procedimentos experimentais empregados para determinação de aminos biogênicas em peixes, carnes e produtos destinados à animais domésticos pela técnica de SALLE proposta é descrita nesta seção.

4.5.1 Otimização da etapa de extração ácida das amostras

Para a extração das aminos biogênicas das matrizes alimentares, 10 mL de HCl 1 mol L⁻¹ foram adicionados à 2,0 g de amostra e a solução centrifugada a 7500 x g. Para avaliar a influência das condições adotadas no processo de lixiviação ácida da amostra foram realizados ensaios alterando o tempo de centrifugação e ensaios em que uma etapa de agitação foi realizada previamente à centrifugação. Os ensaios foram realizados em triplicata em uma amostra de atum em conserva com água. Na Figura 9 estão representadas as alterações no sinal dos derivatizados das aminos obtidos pelo detector de fluorescência em procedimentos realizados com 5, 10 e 20 minutos de centrifugação e em procedimentos com 10 minutos de agitação seguidos de 5, 10 e 20 minutos de centrifugação.

Foi estabelecido o tempo de 20 minutos de centrifugação para a etapa de lixiviação ácida, uma vez que essa condição forneceu os maiores sinais para espermidina e espemina, por essas aminos estarem presentes em quantidades elevadas nas amostras estudadas e apresentarem uma grande variabilidade, portanto, uma condição que favoreça a determinação dessas duas aminos é mais vantajosa em relação as outras condições. Em relação as outras aminos biogênicas, a lixiviação ácida com 20 minutos de centrifugação forneceu resultados comparáveis com as demais condições avaliadas, que se adotadas demandariam mais tempo ou etapas.

Trabalhos que envolvem a determinação de aminos biogênicas e são realizados com derivatização com DNS-Cl, geralmente utilizam altas temperatura e um período longo para a reação (HU, 2012; JAIN, 2018; PAPAGEORGIOU, 2018; RESTUCCIA, 2015; SPIZZIRRI, 2019). Para comparação do procedimento adotado no método SALLE com outros procedimentos encontrados na literatura foram realizadas reações de derivatização das ABs com DNS-Cl à 60 °C durante um período de 30 minutos. A repetibilidade e a recuperação foram testadas em seis

amostras de concentrações baixas, de 2 mg L^{-1} , de cada AB (putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina) que correspondem as faixas de concentração mais comumente encontradas em amostras de peixe enlatado. O desvio padrão relativo obtido na repetibilidade das amostras analisadas por esse procedimento foi de 11 % para espermidina, 42 % para cadaverina e 67 % para putrescina e tiramina. A recuperação observada foi de 7,9 % para putrescina, 9,1 % para cadaverina, 9,9 % para espermidina e 10 % para tiramina. A espermina só pode ser observada em uma das amostras, com uma recuperação de 15 %. Histamina não foi detectada em nenhuma das amostras. Esses resultados mostraram que o método SALLE proposto forneceu recuperações mais altas dos analitos de interesse e é uma melhor opção para a realização dos experimentos.

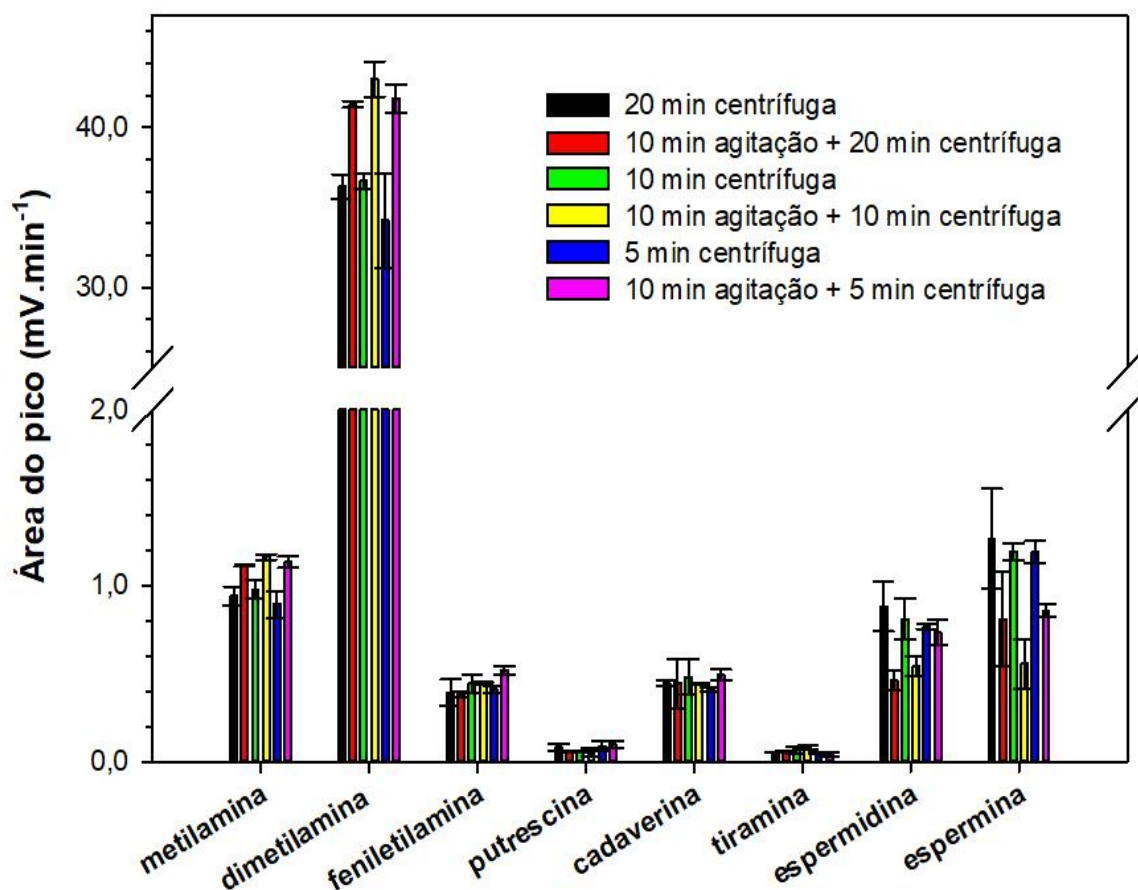


Figura 9 – Área do pico dos derivatizados das aminas biogênicas obtidos pelo detector fluorescência após processo de lixiviação da amostra sob diferentes condições

Fonte: Elaborada pela Autora (2018).

4.5.2 Avaliação dos parâmetros analíticos do método

Na Figura 10 estão representados os cromatogramas obtidos pelos detectores ultravioleta (UV) e fluorescência (FL) de uma amostra de solução padrão contendo todas as aminas biogênicas em concentração de 20 mg L^{-1} e analisadas por HPLC.

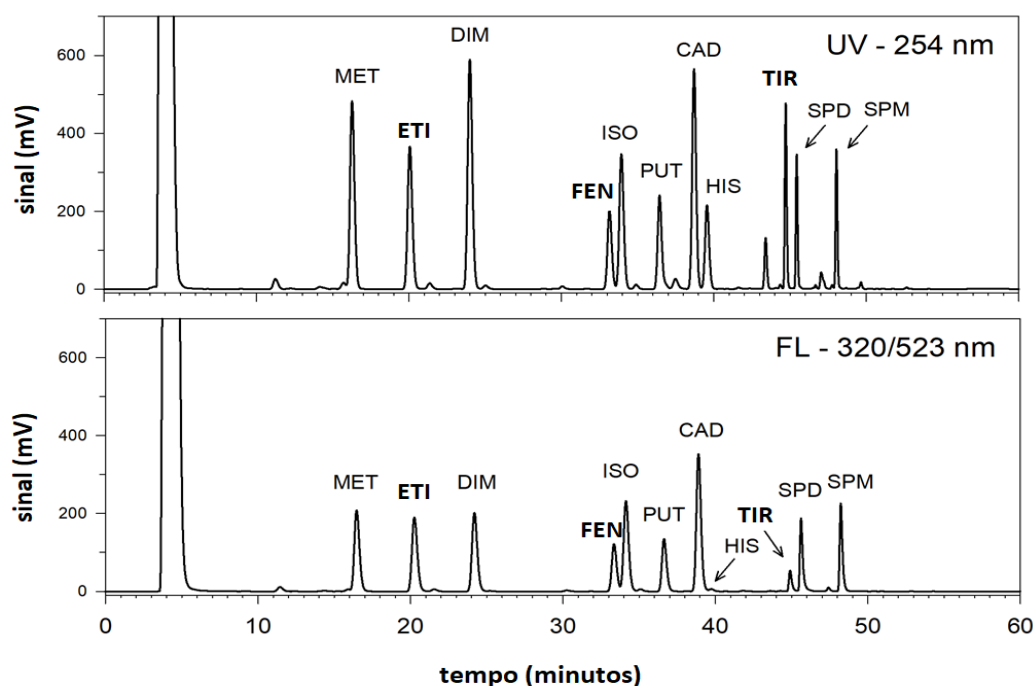


Figura 10 – Cromatograma de uma solução padrão contendo todas as aminas biogênicas em concentração de 20 mg L^{-1}
Fonte: Elaborada pela Autora (2018).

Soluções padrão contendo todas as ABs foram preparadas e submetidas ao procedimento de extração e análise. As curvas de calibração foram construídas em triplicata, plotando-se as áreas dos picos dos derivatizados das ABs versus sua concentração. As curvas de calibração obtidas pela análise por UV e por fluorescência (FL) estão representadas nas Figuras 11 ((a) metilamina e (b) etilamina), Figura 12 ((a) dimetilamina e (b) isopentilamina), Figura 13 ((a) 2-fentiletilamina e (b) putrescina), Figura 14 ((a) cadaverina e (b) histamina), Figura 15 ((a) tiramina e (b) espermidina) e Figura 16 (espermina). Os parâmetros analíticos e os coeficientes de determinação da curva de calibração construída com os valores determinados pelo detector UV são mostrados na Tabela 1 e os parâmetros analíticos e os coeficientes de determinação da curva de calibração construída com

os valores determinados pelo detector FL são mostrados na Tabela 2. As equações e os coeficientes de determinação foram obtidos por meio de regressão linear (método dos mínimos quadrados). Os coeficientes de determinação estiveram entre 0,992 e 0,999, mostrando uma boa linearidade para todas as ABs para o detector UV e para o detector de fluorescência. Os limites de detecção (LDs) e quantificação (LQs) foram calculados como três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão da relação entre intercepto e declive da curva de calibração. Os LDs e LQs para a quantificação com detector UV variaram entre 0,042 e 0,850 mg kg⁻¹ e entre 0,130 e 2,50 mg kg⁻¹, respectivamente. Para a análise por fluorescência, os LDs variaram entre 0,038 e 8,00 mg kg⁻¹ e os LQs entre 0,115 e 24,5 mg kg⁻¹. Os maiores LDs e LQs foram encontrados para a histamina e o detector UV foi escolhido para sua quantificação, por ter mostrado detecção mais sensível para este composto. Os LDs e LQs determinados pelo detector fluorescência foram apropriados para quantificar os níveis das demais ABs nas amostras.

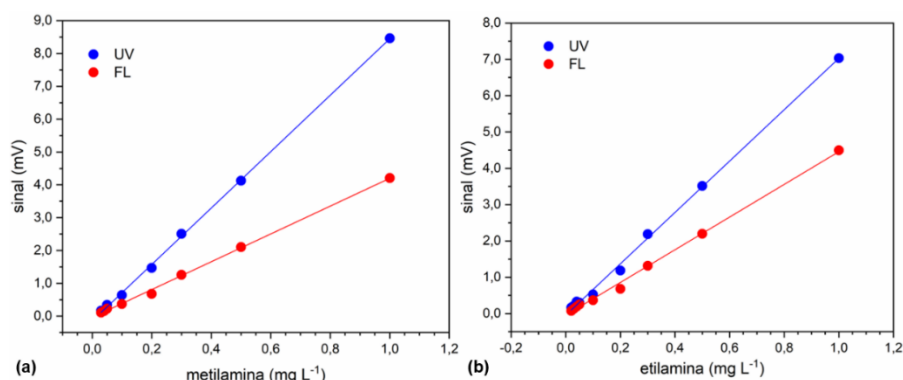


Figura 11 – Curva analítica para (a) metilamina e (b) etilamina obtidas por detector UV e FL

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

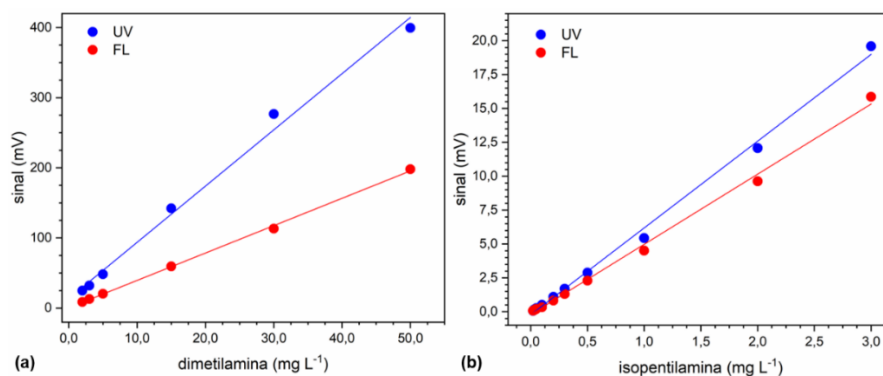


Figura 12 – Curva analítica para (a) dimetilamina e (b) isopentilamina obtidas por detector UV e FL

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

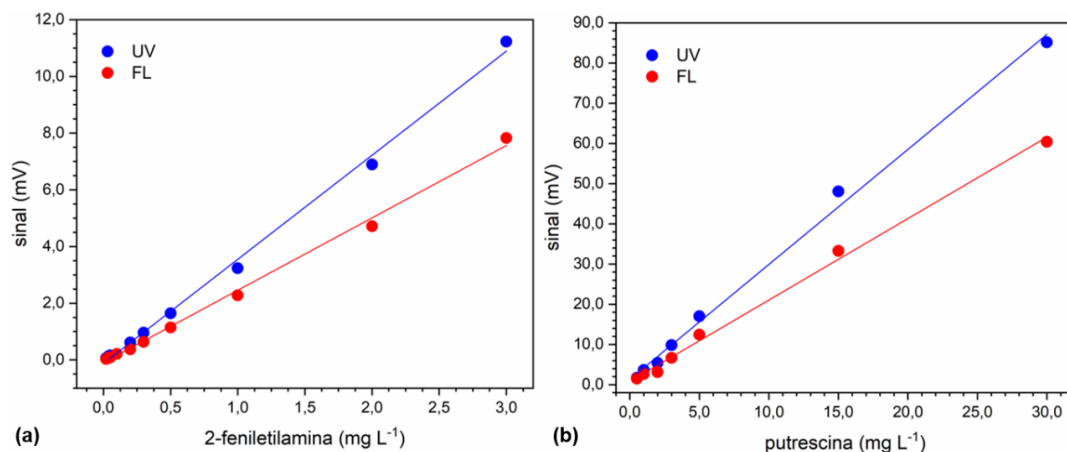


Figura 13 – Curva analítica para (a) 2-feniletilamina e (b) putrescina obtidas por detector UV e FL

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

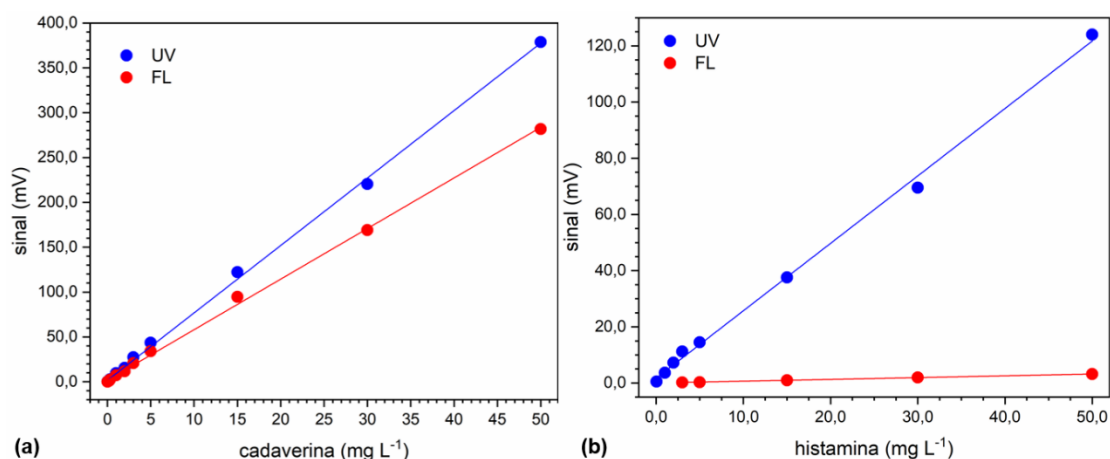


Figura 14 – Curva analítica para (a) cadaverina e (b) histamina obtidas por detector UV e FL

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

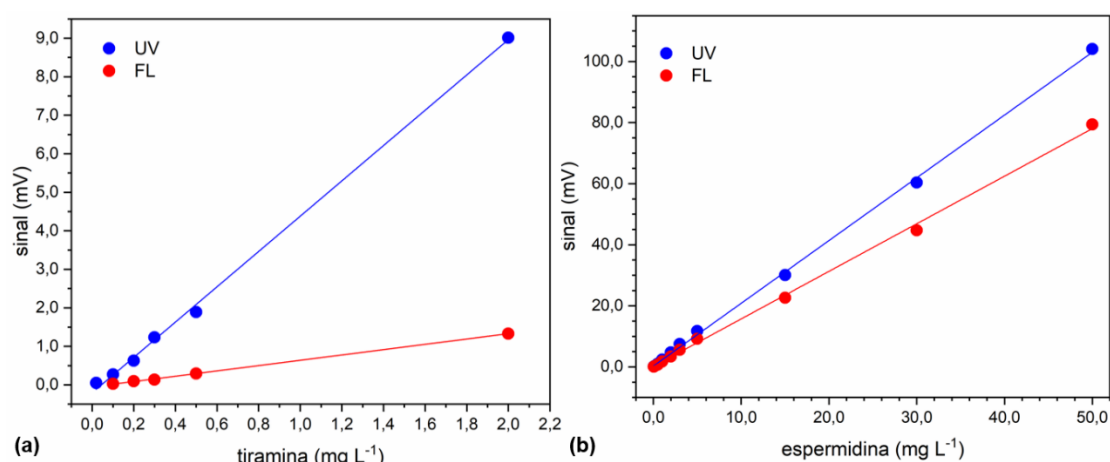


Figura 15 – Curva analítica para (a) tiramina e (b) espermidina obtidas por detector UV e FL

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

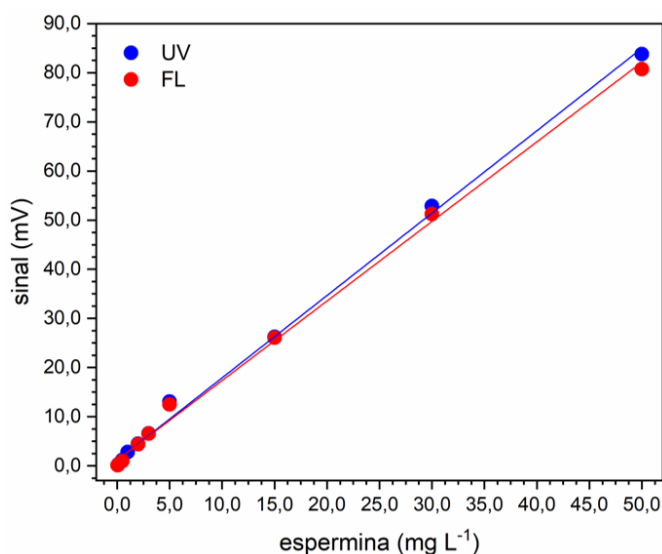


Figura 16 – Curva analítica para espermina obtida por detector UV e FL
Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Para investigar a possibilidade de efeito de matriz no processo de extração, as curvas de calibração também foram preparadas em um extrato de atum enlatado. O extrato foi preparado pela adição de padrões de ABs em quatro diferentes níveis de concentração, que foram escolhidos de acordo com as quantidades estimadas de cada analito na amostra. As análises foram realizadas em triplicata. A inclinação e os interceptos das equações lineares obtidas pelas curvas de calibração preparadas em solvente e pelas curvas preparadas com amostras enriquecidas com padrões de ABs foram comparadas pelo teste t de *Student* com intervalo de confiança de 95 %. Como não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as inclinações dos dois modelos de calibração, adotou-se o método da curva de calibração externa para quantificação das ABs.

A repetibilidade do método foi avaliada por extração e análise no mesmo dia de seis réplicas de uma amostra de atum em conserva enriquecida com padrões de ABs. Os valores obtidos para a área do pico apresentaram desvio padrão relativo menor que 7,3 % (FL) e menor que 15,4 % (UV). A reprodutibilidade foi avaliada da mesma forma, mas foram analisadas seis réplicas das amostras em cinco dias consecutivos. O desvio padrão relativo da reprodutibilidade variou de 3,6 % a 19,3 % (FL) e de 3,0 % a 19,2 % (UV). As recuperações foram calculadas adicionando quantidades conhecidas de cada AB a uma amostra de atum em conserva, submetendo-a aos procedimentos de extração e análise e verificando a proximidade dos resultados obtidos com os resultados esperados. Os valores médios de

recuperação de seis amostras variaram de 86,5 a 111 % (FL) e de 80,1 % a 115 % (UV).

Tabela 1 – Parâmetros analíticos do método proposto determinados pelo detector UV

Ultravioleta (UV)						
AB	r ²	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)	DPR ^a (%)	DPR ^b (%)	Recupe- ração (%)
metilamina	0,999	0,150	0,450	2,3	7,6	112
etilamina	0,999	0,042	0,130	3,0	6,7	95,0
dimetilamina	0,996	0,500	1,55	1,4	4,3	112
2-feniletilamina	0,999	0,038	0,115	2,2	5,3	94,4
isopentilamina	0,998	0,060	0,175	1,7	3,0	105
putrescina	0,997	0,080	0,240	5,9	10	115
cadaverina	0,992	0,110	0,370	15	7,0	99,9
histamina	0,998	0,850	2,50	2,3	9,4	93,6
tiramina	0,995	0,100	0,300	3,0	5,4	103
espermidina	0,995	0,460	1,40	13	14	80,1
espermina	0,996	0,380	1,15	6,0	19	87,0

Fonte: Elaborada pela Autora (2018).

Nota:

^a – repetibilidade

^b - reprodutibilidade

Tabela 2 – Parâmetros analíticos do método proposto determinados pelo detector FL

Fluorescência (FL)						
AB	r ²	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)	DPR ^a (%)	DPR ^b (%)	Recupe- ração (%)
metilamina	0,999	0,070	0,210	2,0	5,5	102
etilamina	0,998	0,095	0,295	2,2	4,0	86,5
dimetilamina	0,997	0,405	1,25	3,0	3,9	107
2-feniletilamina	0,994	0,110	0,330	1,7	4,8	95,4
isopentilamina	0,999	0,038	0,115	1,7	3,6	100
putrescina	0,996	0,220	0,650	2,6	7,9	114
cadaverina	0,992	0,280	0,950	7,3	8,4	106
histamina	0,999	8,00	24,5	4,0	10	111
tiramina	0,999	0,36	1,10	3,4	7,2	98,1
espermidina	0,994	0,500	1,55	3,6	15	103
espermina	0,996	0,420	1,30	6,0	19	105

Fonte: Elaborada pela Autora (2018).

Nota:

^a – repetibilidade

^b - reprodutibilidade

4.5.3 Ensaios de degradação das amostras

Foram analisadas as mudanças no conteúdo de AB em amostras de alimentos submetidas a uma degradação sob condições extremas, pois não foram adotadas as rigorosas normas de controle para análise de alimentos. Essa condição foi adotada pois buscou-se reproduzir condições próximas de situações reais de armazenamento e cuidados do alimento pelos consumidores. Amostras de atum em conserva com água, atum em conserva com azeite, sardinha em conserva com óleo, sardinha fresca, salsicha de peru, de frango e de porco, carne de vitela e produtos à base de peixe e carne destinados para alimentação animal foram armazenados sob diferentes condições de temperatura (*freezer*, geladeira e temperatura ambiente) ao longo de diferentes períodos de tempo. Os resultados estão divididos em produtos à base de peixe e produtos à base de carne.

4.5.3.1 Aminas biogênicas em amostras a base de peixe

O conteúdo de aminas biogênicas em peixes varia muito de acordo com a espécie e origem do peixe e é influenciado pela microbiota encontrada em seu ambiente aquático, sendo fatores importantes para a sua formação a presença de aminoácidos livres e de bactérias com atividade descarboxilase (CHONG *et al.*, 2014; SHAKILA; VIJAYALAKSHMI; JEYASEKARAN, 2003). Condições de higiene precárias durante o manuseio e armazenamento também podem contribuir para uma proliferação microbiana e acúmulo de aminas nesse alimento (BILGIN; GENÇCELEP, 2015). A concentração das ABs geralmente cresce gradualmente conforme prolonga-se o tempo de armazenamento dos peixes, devido a proteólise promovida por proteases endógenas e exógenas, que liberam os aminoácidos da cadeia peptídica (HU *et al.*, 2012).

SPM foi a principal AB encontrada nas amostras controle de peixes (amostra analisada logo após a abertura) e permaneceu como a amina predominante quando o alimento foi armazenado à baixas temperaturas, sendo o valor mais alto de 5,20 mg kg⁻¹ encontrado em uma amostra de atum em conserva de azeite após 8 horas de armazenamento à - 4 °C. Sob - 4 e 4 °C, SPD e SPM apresentaram flutuações na concentração com um valor mínimo observado no 4º dia em conservas de atum em azeite e no 6º dia em conservas de atum em água. Comportamento

semelhante para SPD e SPM sob baixas temperaturas foi relatado por outros autores (CHONG *et al.*, 2014; VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL-CAROU, 1997). A sardinha foi a única amostra de peixe em que pode ser observado um processo de degradação à 4 °C, com aumento de PUT para 8,12 mg kg⁻¹, de CAD para 130 mg kg⁻¹, de TIM para 17,5 mg kg⁻¹ e de HIM para 50,0 mg kg⁻¹ ao final do período de armazenamento. Os gráficos referentes às amostras armazenadas à - 4 °C estão representados na Figura 17 ((a) cadaverina, (b) putrescina, (c) espermidina e (d) espermina). Os gráficos referentes às amostras de peixe armazenadas à 4 °C estão representados nas Figura 18 ((a) e (b) cadaverina, (c) tiramina e (d) histamina) e Figura 19 ((a) putrescina, (b) espermidina e (c) espermina).

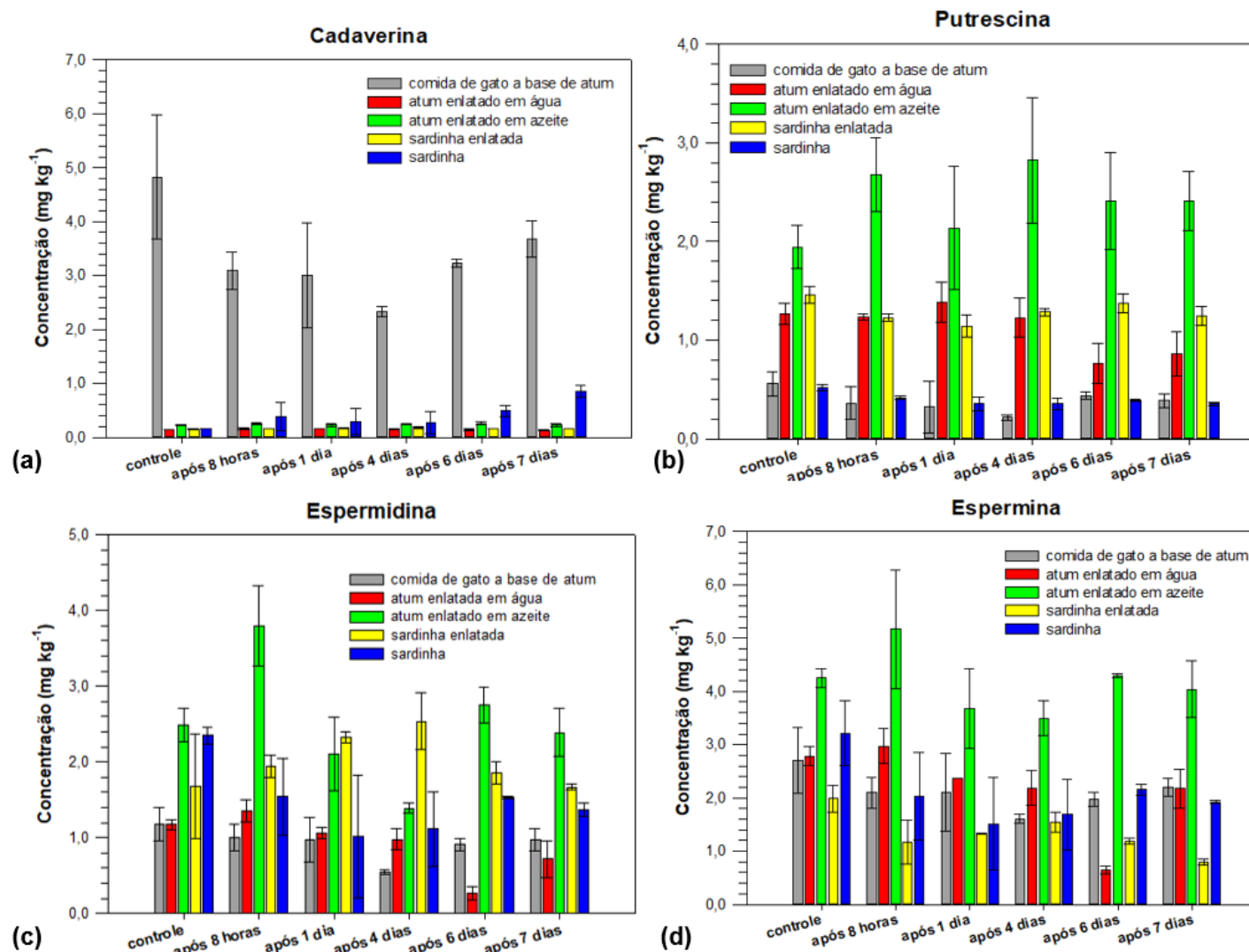


Figura 17 – Concentração de ABs nas amostras à base de peixe armazenadas à - 4 °C ao longo de 7 dias
(a) cadaverina, (b) putrescina, (c) espermidina e (d) espermina

Fonte: Elaborada pela Autora (2019).

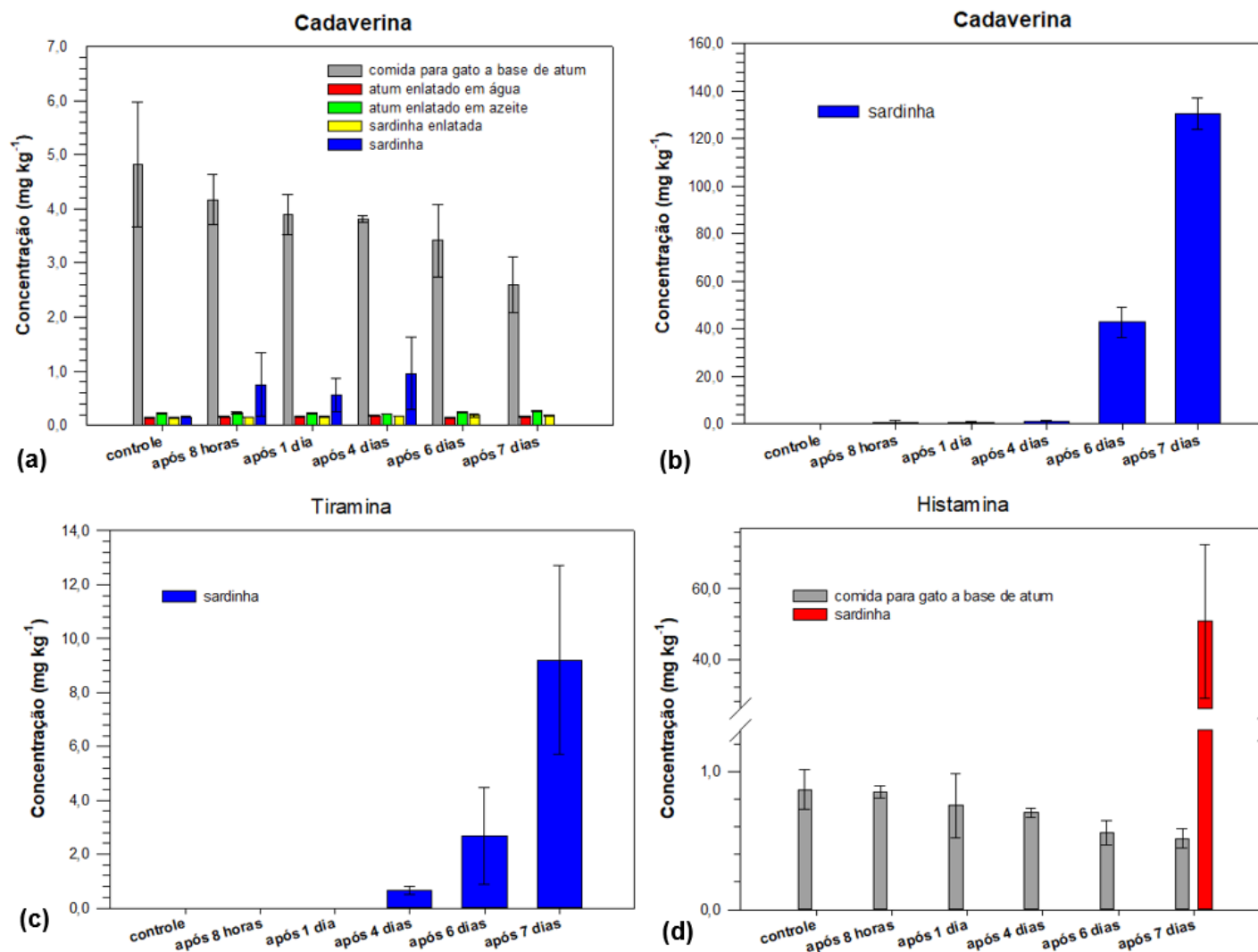


Figura 18 – Concentração de ABs nas amostras à base de peixe armazenadas à 4 °C ao longo de 7 dias: (a) cadaverina, (b) cadaverina na amostra de sardinha, (c) tiramina na amostra de sardinha e (d) histamina

Fonte: Elaborada pela Autora (2019).

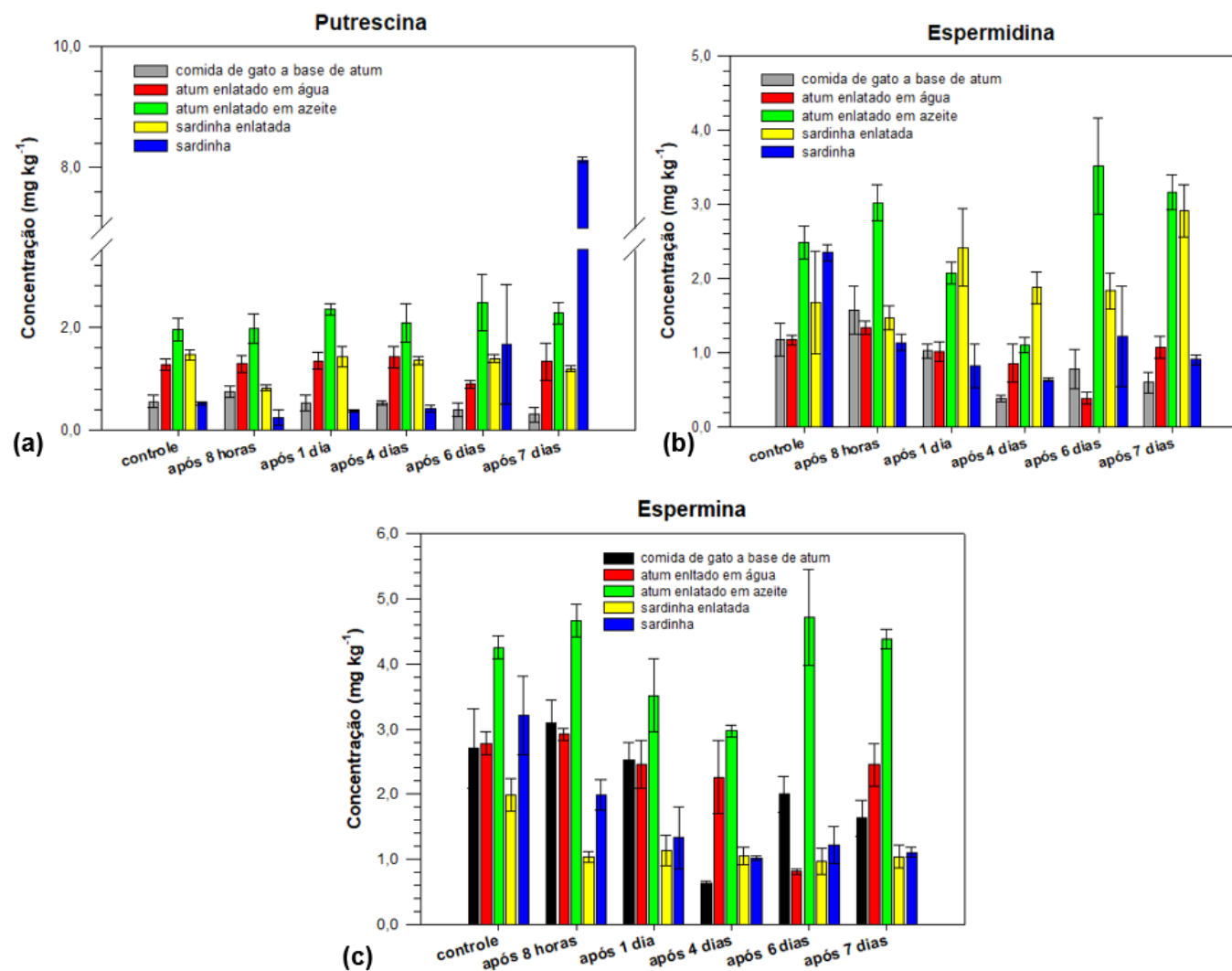


Figura 19 – Concentração de ABs nas amostras à base de peixe armazenadas à 4 °C ao longo de 7 dias: (a) putrescina, (b) espermidina e (c) espermina

Fonte: Elaborada pela Autora (219).

Nas amostras de alimento para animais domésticos, a CAD foi a principal amina observada durante os diferentes dias de análise, com um valor inicial de 4,80 mg kg⁻¹, enquanto SPM estava com 2,71 mg kg⁻¹. Este nível de CAD foi superior aos níveis observados para as amostras de peixe e estes resultados podem ser reflexo da má qualidade da matéria-prima utilizada na produção de alimentos para animais de estimação em comparação com aqueles destinados ao consumo humano. Na industrialização de produtos de pesca há muito desperdício de alimentos, mas como este alimento é rico em proteínas e lipídios pode ser processado e utilizado para nutrição humana e animal (ÖZYURT *et al.*, 2016). A indústria de *pet food*, tradicionalmente, utiliza uma ampla variedade de fontes de proteína provenientes de resíduos da produção de alimentos, o que inclui ingredientes classificados como subprodutos de origem animal (FOLADOR *et al.*, 2006). Os subprodutos da pesca requerem uma grande quantidade de processamento antes de serem adicionados aos produtos finais, destinados à alimentação animal, e o manuseamento ou armazenamento incorretos durante as diferentes fases de processamento pode levar à formação de altas concentrações de ABs. Apesar dos níveis iniciais de CAD observados em ração à base de atum serem mais altos em comparação com as demais amostras de peixe, a maioria dos níveis de ABs permaneceu constante nesta amostra durante o armazenamento à 22 °C, com exceção de SPD e SPM que apresentaram pequena flutuação. Uma das razões para essa observação pode ser o acréscimo de aditivos durante a produção de alimentos, que controlam a atividade microbiana e impedem a formação de ABs.

As alterações nas amostras de peixes armazenadas à 22 °C estão representadas nas Figura 20 ((a) e (b) cadaverina e (c) e (d) putrescina) e Figura 21 (a) espermidina, (b) espermina) e (c) histamina, nessas amostras a concentração de CAD aumentou de 0,14 para 9,02 mg kg⁻¹, de 0,23 para 24,4 mg kg⁻¹, de 0,14 para 1,61 mg kg⁻¹ e de 0,16 para 795 mg kg⁻¹ nas conservas de atum em água, atum em azeite, sardinha enlatada e sardinha fresca, respectivamente. A CAD tornou-se a principal amina na sardinha fresca depois de um dia de armazenamento e depois de quatro dias nas conservas de atum. PUT aumentou de 1,26 para 13,3 mg kg⁻¹ na amostra de atum em água, de 1,94 para 9,80 mg kg⁻¹ no atum em azeite, de 1,46 para 8,24 mg kg⁻¹ em sardinha enlatada e de 0,52 para 183 mg kg⁻¹ na sardinha. A partir do 4º dia, a PUT foi a principal AB detectada em conservas de atum em água e em conserva de sardinha. A SPD variou de 1,18 à 4,43 mg kg⁻¹ no atum em água, de

2,50 à 12,2 mg kg⁻¹ no atum em azeite, de 1,68 à 3,33 mg kg⁻¹ na sardinha enlatada e de 2,35 à 1,27 mg kg⁻¹ na sardinha fresca. Os níveis de SPM diminuíram de 2,78 para 0,57, de 4,25 para 3,00, de 1,98 para 0,11 e de 3,22 para 0,98 mg kg⁻¹ nas conservas de atum em água, atum em azeite, sardinha em lata e sardinha fresca, respectivamente. HIM pode ser detectada nessa temperatura de armazenamento a partir do 4º dia nas conservas de atum em água e atum em azeite, mas permaneceu com níveis abaixo de 1 mg kg⁻¹ durante todo o período de armazenamento, enquanto nas amostras de sardinha fresca a HIM apresentou uma concentração de 1,01 mg kg⁻¹ após um dia de armazenamento e atingiu 455 mg kg⁻¹ no final do período avaliado. Nas amostras de sardinha armazenadas à 22 °C, também foi observado um aumento nos níveis de TIM, que atingiu concentração de 229 mg kg⁻¹ após sete dias de armazenamento. Diferenças notáveis podem ser observadas comparando a degradação de uma amostra sem qualquer tipo de processo, como a sardinha, com amostras de peixe enlatado. A degradação em sardinha começou antes e foi mais intensa do que nas amostras de peixes enlatados, alcançando os maiores valores observados entre essas amostras para CAD, PUT, TIM e HIM após um dia de armazenamento.

O acúmulo de PUT foi maior que o acúmulo de CAD ao longo do período estudado para conservas de atum em água e sardinha enlatada, enquanto que na conserva de atum em azeite e na sardinha fresca a concentração final de CAD foi superior à de PUT. O aumento de HIM ocorre em estágios posteriores de degradação e, portanto, sozinha essa AB não configura um índice de qualidade confiável, porém é importante destacar que mesmo quando níveis de HIM estão abaixo dos limites legais estabelecidos, essa amina pode ter seus efeitos toxicológicos potencializados quando há a presença de PUT e CAD, pois estas aminas competem com o mecanismo de desintoxicação da HIM (FENG; TEUBER; GERSHWIN, 2016).

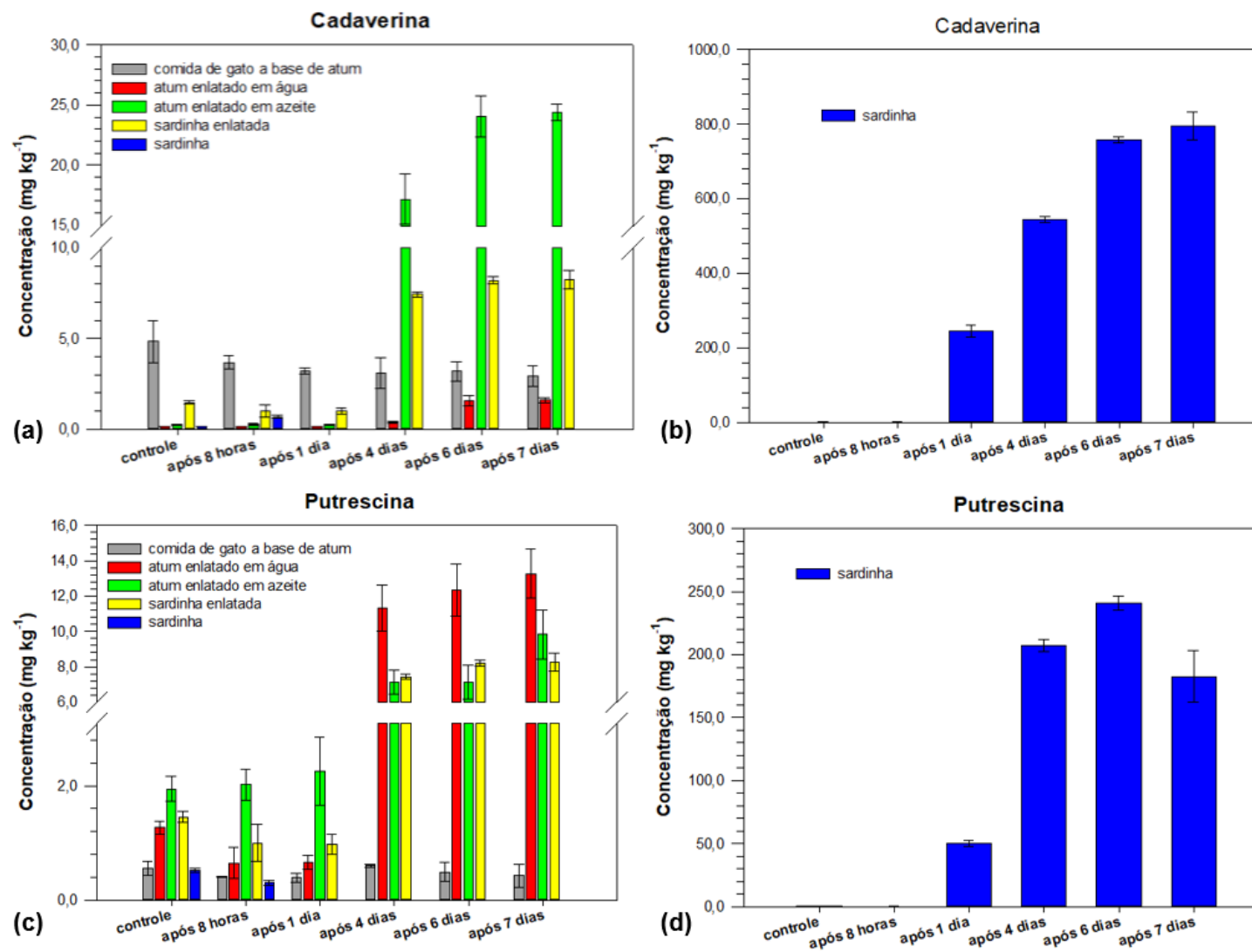


Figura 20 – Concentração de ABS nas amostras à base de peixe armazenadas à 22 °C ao longo de 7 dias: (a) cadaverina, (b) cadaverina na sardinha, (c) putrescina e (d) putrescina na sardinha

Fonte: Elaborada pela Autora (2019).

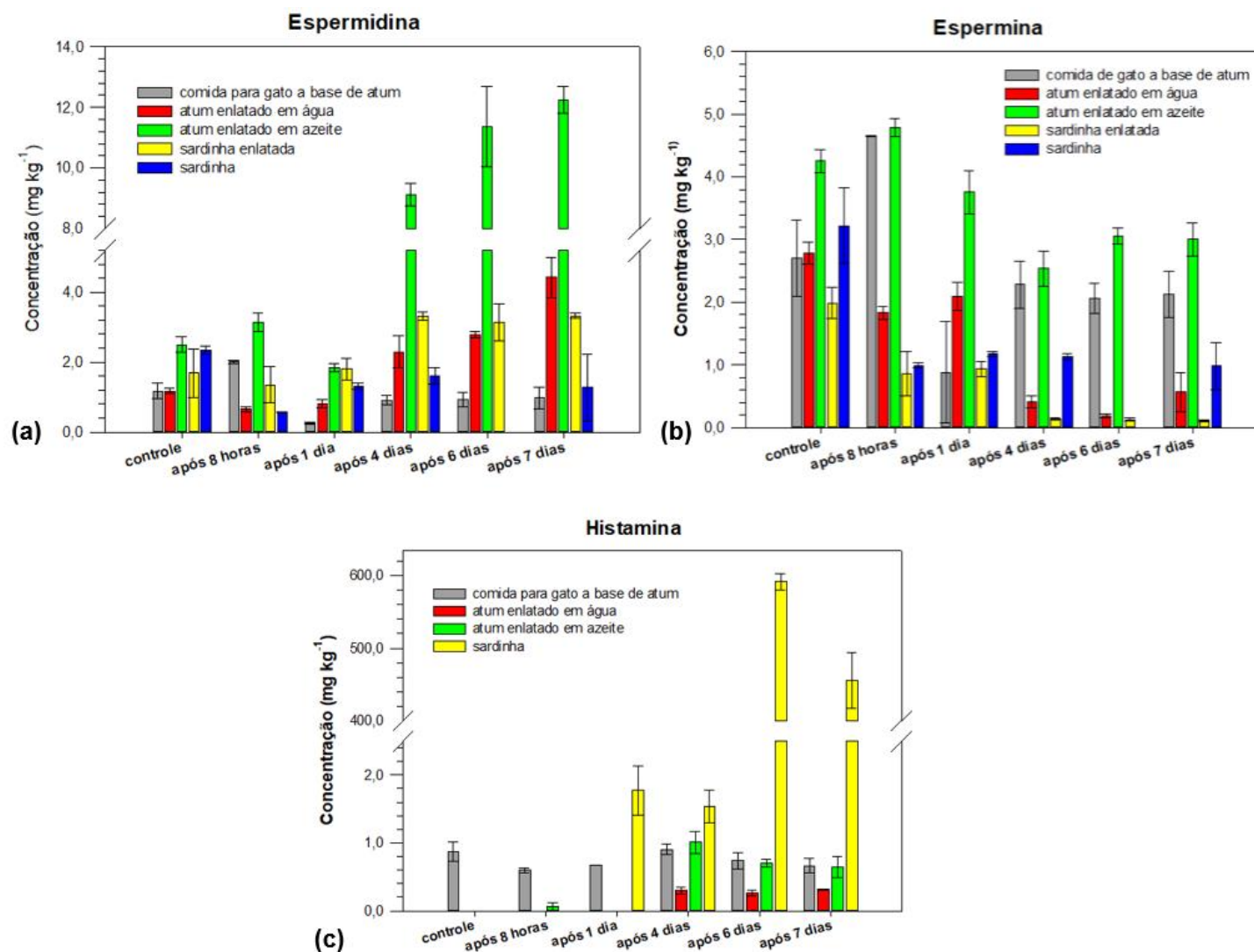


Figura 21 – Concentração de ABs nas amostras à base de peixe armazenadas à 22 °C ao longo de 7 dias: (a) espermidina, (b) espermina) e (c) histamina

Fonte: Elaborada pela Autora (2019).

Outros trabalhos referentes à determinação de ABs em peixes utilizando diferentes técnicas de análise também encontraram níveis e comportamentos semelhantes para as ABs. Köse *et al.* (2012) encontraram valores de 0,6 mg kg⁻¹ para CAD, 0,7 mg kg⁻¹ para SPD e 0,9 mg kg⁻¹ para SPM em sardinha enlatada. Park *et al.* (2010) encontraram concentrações médias de 1,8 mg kg⁻¹ para PUT, 1,7 mg kg⁻¹ para CAD, 3,2 mg kg⁻¹ para TIR, 3,0 mg kg⁻¹ para SPD e 4,4 mg kg⁻¹ para SPM em uma amostra de atum em conserva. Zhai *et al.* (2012) analisaram ABs em conservas de sardinha e obtiveram valores de 1,8 mg kg⁻¹ para PUT, 1,8 mg kg⁻¹ para CAD, 7,5 mg kg⁻¹ para HIM e 0,40 mg kg⁻¹ para SPM. Bilgin e Gençcelep (2015) determinaram os teores de AB em atum enlatado e sardinha enlatada e encontraram os maiores valores de HIM, PUT e TIM em atum enlatado, com concentrações de 110,3, 116,5 e 48 mg kg⁻¹, respectivamente, enquanto a CAD foi observada em maior concentração em sardinha enlatada com 122, mg kg⁻¹. Parchami, Kamalabadi e Alizadeh (2017) utilizaram amostras de peixe enlatado e obtiveram valores médios de 0,433 mg kg⁻¹ para PUT, 0,047 mg kg⁻¹ para HIM e 0,104 mg kg⁻¹ para CAD. Veciana-Nogues, Mariné-Font e Vidal-Carou (1997) encontraram SPD e SPM como ABs predominantes em atum armazenado sob diferentes temperaturas, onde as concentrações de SPD permaneceram constantes durante o período analisado, com um valor médio de 5,44 mg kg⁻¹, enquanto os valores de SPM diminuíram de 14,6 para 10,2 mg kg⁻¹ após 21 dias à 0 °C, para 10,9 mg kg⁻¹ após 9 dias à 8 °C e para 12,2 mg kg⁻¹ após 4 dias à 20 °C.

4.5.3.2 Aminas biogênicas em amostras à base de carne

A formação de aminas biogênicas em alimentos de origem animal a base de carnes está relacionada as espécies de bactérias presentes no alimento e ao seu crescimento, que serão determinantes para a presença de enzimas descarboxilases. A matéria-prima atua como fonte de substratos (aminoácidos) e como meio de reação e sua origem e qualidade representam fatores de fundamental importância para a formação de aminas biogênicas. Esses fatores são ainda influenciados pelos processos tecnológicos utilizados para cada tipo de carne, de acordo com a destinação do alimento produzido (fresco, cozido, assado, defumado ou fermentado) e pelas condições de armazenamento, principalmente aquelas relacionadas ao tempo e temperatura de armazenamento e à embalagem utilizada no produto

(JAIRATH *et al.*, 2015). SPM e SPD são as únicas aminas presentes em níveis significativos na carne fresca, as demais aminas, principalmente TIM, PUT e CAD, atingem níveis significativos conforme aumenta a atividade de descarboxilação microbiana dos correspondentes aminoácidos precursores dessas aminas, tirosina, ornitina e lisina, respectivamente (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2018). Os produtos fermentados contêm quantidades consideravelmente mais elevadas de AB, pois os microrganismos utilizados para promover a fermentação podem também contribuir para sua formação e acúmulo (JAIRATH *et al.*, 2015; ÖZOGUL; HAMED, 2018).

Nas amostras de carne bovina armazenadas à - 4 °C, a CAD aumentou de 0,23 para 0,97 mg kg⁻¹, a PUT de 0,20 para 1,21 mg kg⁻¹, a SPD de 0,71 para 3,33 mg kg⁻¹, enquanto a SPM diminuiu de 2,54 para 0,56 mg kg⁻¹. Os gráficos com as variações das AB nas amostras armazenadas à - 4 °C estão representados na Figura 22 ((a) cadaverina, (b) putrescina, (c) espermidina e (d) espermina). Entre as amostras de carne bovina armazenadas à 4 °C (Figura 23), a TIM foi a AB que apresentou o maior aumento ao longo do tempo, atingindo um valor máximo de 12,2 mg kg⁻¹ após 7 dias de armazenamento, enquanto CAD aumentou para 9,12 mg kg⁻¹ e PUT para 1,34 mg kg⁻¹ na mesma amostra.

As amostras de carne bovina armazenadas à 22 °C estão representadas na Figura 24 ((a) cadaverina), (b) putrescina, (c) espermidina) e (d) espermina) e na Figura 25 ((a) tiramina e (b) histamina). Nessas amostras, foi observado um aumento nas concentrações de PUT, CAD, SPD, SPM e TIM ao longo dos dias de análise, que alcançaram valores de 25,3; 66,4; 1,74; 6,91 e 76,2 mg kg⁻¹, respectivamente. SPM e SPD foram as únicas aminas presentes em níveis significativos nas amostras de carne fresca, uma vez que são poliaminas naturais, as outras ABs são formadas durante o armazenamento ou processamento e podem atingir níveis significativos à medida que aumenta a descarboxilação microbiana de aminoácidos específicos (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2018). O aumento mais rápido e precoce da CAD em relação a PUT foi documentado na literatura e associado a deterioração microbiana, temperatura de armazenamento e tempo de armazenamento (GALGANO *et al.*, 2009).

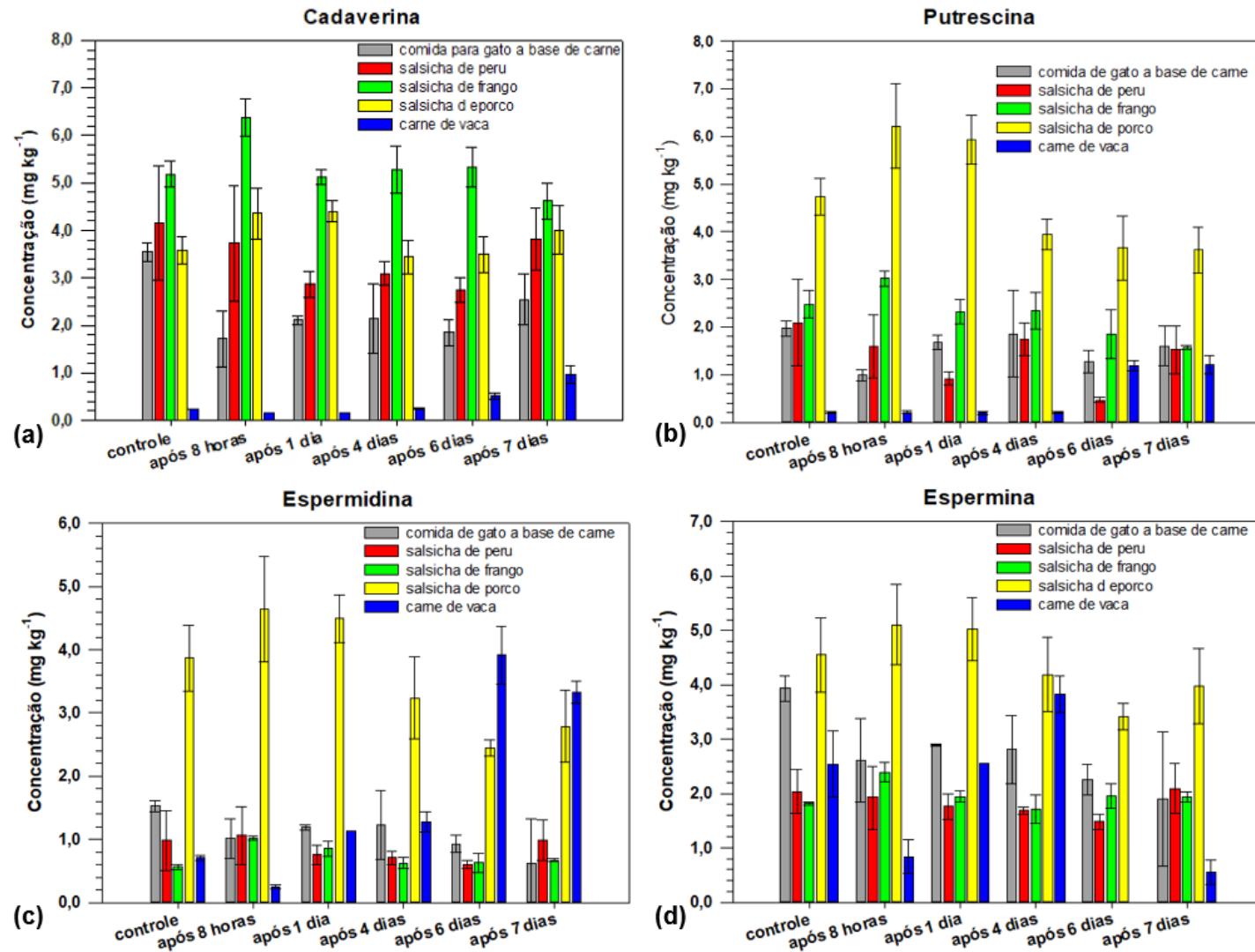


Figura 22 – Concentração de ABs nas amostras à base de carne armazenadas à - 4 °C ao longo de 7 dias: (a) cadaverina, (b) putrescina, (c) espermidina e (d) espermina

Fonte: Elaborada pela Autora (2019).

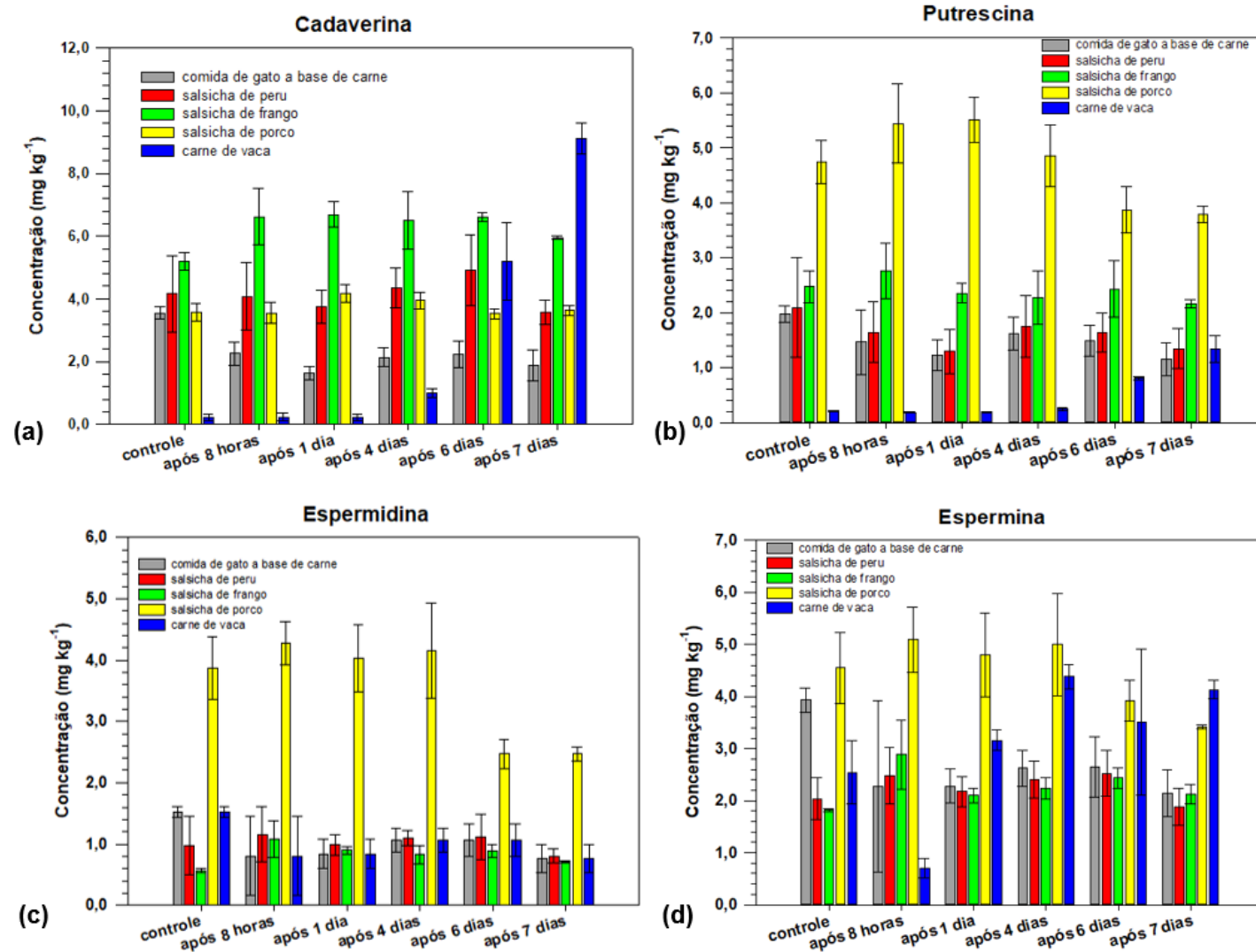


Figura 23 – Concentração de ABs nas amostras à base de carne armazenadas à 4 °C ao longo de 7 dias: (a) cadaverina, (b) putrescina, (c) espermidina e (d) espermina

Fonte: Elaborada pela Autora (2019).

Os níveis de HIM não apresentaram aumento significativo durante o tempo de armazenamento nas amostras armazenadas à 22 °C, semelhante ao relatado na literatura por diversos autores (FAVARO *et al.*, 2007; GALGANO *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ-JOVER *et al.*, 1997). No entanto, a ração a base de carne apresentou os maiores níveis de HIM entre as amostras controle e ao longo do armazenamento à 4 e - 4 °C (mesmo comportamento observado para a ração à base de peixe) com concentração inicial de 2,61 mg kg⁻¹. Os níveis de CAD e PUT também permaneceram mais elevados nos alimentos processados à base de carne do que os observados nas amostras de carne bovina fresca sob condições de baixa temperatura, com 3,55 e 1,97 mg kg⁻¹, respectivamente. Os maiores valores de HIM, CAD e PUT na ração animal evidenciam a qualidade inferior desses produtos em comparação aos produtos destinados à alimentação humana.

Outros autores relataram concentrações médias de 1,77 mg kg⁻¹ (PUT), 1,56 mg kg⁻¹ (CAD), 1,92 mg kg⁻¹ (HIM), 2,07 mg kg⁻¹ (SPD), 9,67 mg kg⁻¹ (SPM) e 1,97 mg kg⁻¹ (TIM) em carne *in natura* e de 2,11; 1,92; 1,85; 2,22; 10,17 e 7,02 mg kg⁻¹ para as respectivas ABs após 8 dias de armazenamento à 4 °C (GALGANO *et al.*, 2009). Em amostras de salsichas armazenadas à - 4 e à 4 °C, nenhuma mudança significativa foi observada para a maioria das ABs ao longo dos dias. Entretanto, a concentração inicial de algumas ABs foi maior que a observada na carne fresca e, mais especificamente, CAD e PUT foram as principais ABs presentes nas amostras controle e também ao longo dos dias de análise. A concentração final mais alta de CAD foi obtida para a amostra de salsicha de frango, com um valor de 5,96 mg kg⁻¹ e a maior concentração de PUT foi obtida em uma salsicha de porco, com um valor de 3,79 mg kg⁻¹. CAD e PUT são geralmente encontradas em carne suína fresca em níveis entre 1 e 2 mg kg⁻¹, respectivamente (DRABIK-MARKIEWICZ *et al.*, 2011). Níveis mais elevados de CAD e PUT em salsichas, comparados à carne bovina e àqueles relatados para carne suína fresca, podem ser resultado das etapas tecnológicas empregadas para a produção deste tipo de alimento (JAIRATH *et al.*, 2015). Muitos tipos de cepas de *Enterobacteriaceae* podem estar presentes em alguns estágios da produção de salsichas e levam à formação de quantidades significativas de PUT e CAD (JAIRATH *et al.*, 2015).

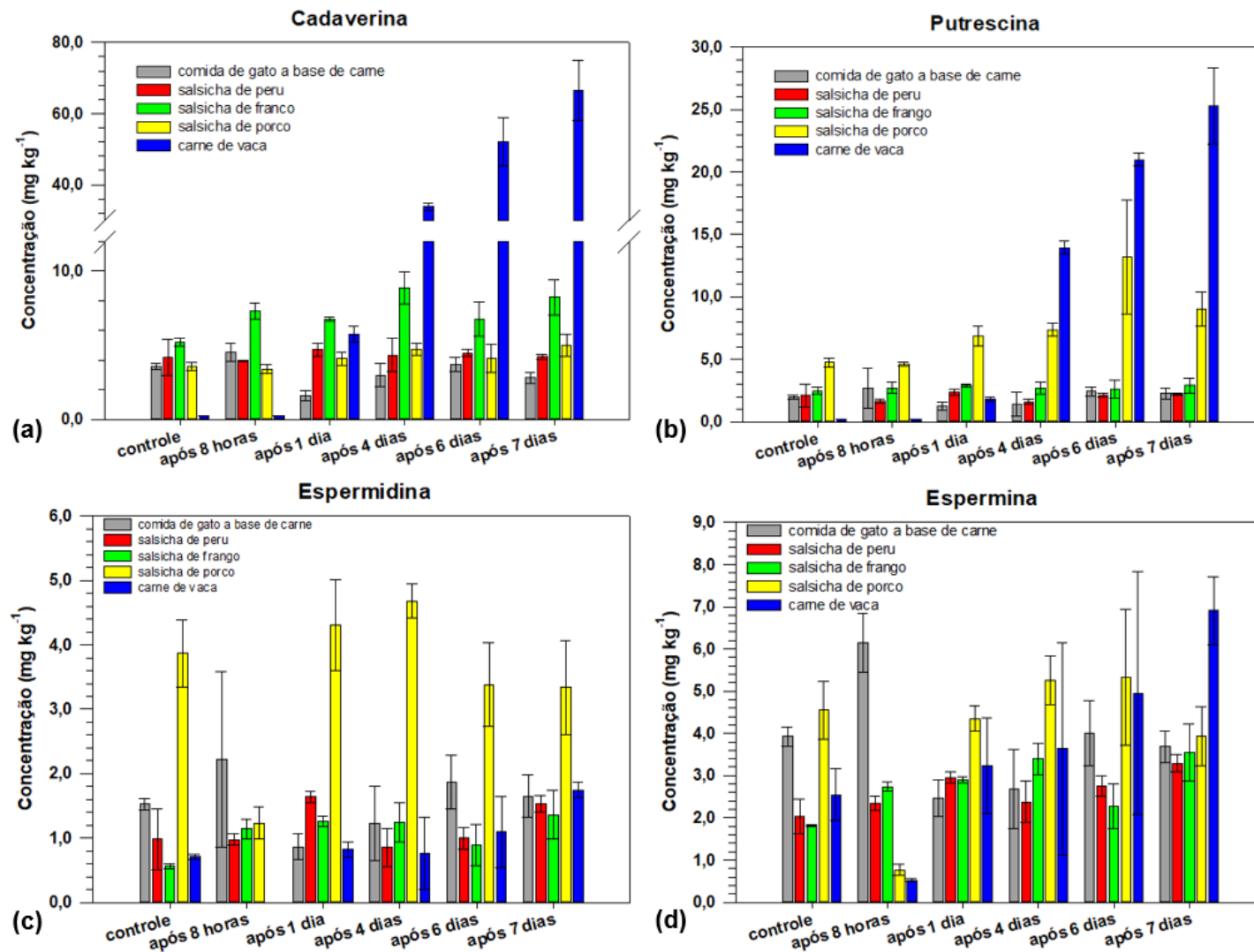


Figura 24 – Concentração de ABs nas amostras à base de carne armazenadas à 22 °C ao longo de 7 dias: (a) cadaverina), (b) putrescina, (c) espermidina) e (d) espermina

Fonte: Elaborada pela Autora (2019).

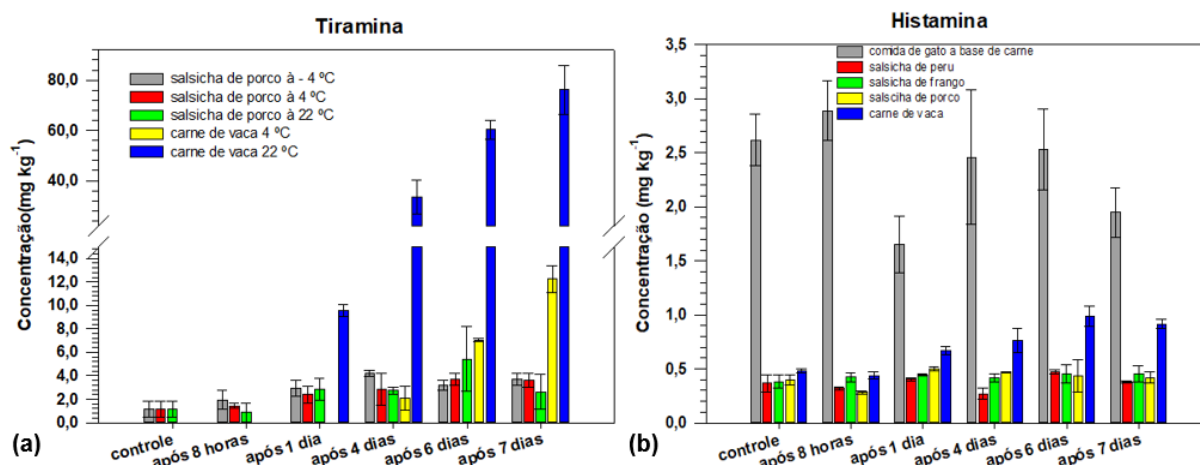


Figura 25 – Concentração de ABs nas amostras à base de carne armazenadas à 22 °C ao longo de 7 dias: (a) tiramina e (b) histamina

Fonte: Elaborada pela Autora (2019).

4.5.4 Índice para avaliação de qualidade com base no conteúdo de aminas biogênicas

Alguns índices são propostos para avaliar a qualidade dos alimentos de acordo com a concentração de determinadas ABs encontradas neles, conforme descrito no item 4.2.7. A Tabela 3 apresenta o IAB_{MK} e o IAB_{VN} calculados para as amostras analisadas. Como pode ser observado, a sardinha armazenada à 22 °C foi a primeira amostra a atingir valores que indicam alta contaminação no alimento e essa condição foi alcançada após apenas um dia de armazenamento. Pelos resultados fornecidos pelos índices, a carne bovina começa a apresentar sinais de contaminação a partir do primeiro dia quando armazenada à 22 °C, e pode ser considerada como contaminada a partir do 4º dia (quando utilizado o IAB_{VN} , que leva em consideração a concentração de TIM) e a partir do 6º dia (quando utilizado o índice IAB_{MK} , que não considera a concentração de TIM para o cálculo). Porém, como esses índices foram elaborados para avaliação de peixes, em relação a avaliação de carnes eles fornecem apenas uma indicação do estado do alimento, mas não podem ser utilizados como critério de avaliação sem que um estudo mais amplo seja realizado.

A sardinha e a carne armazenadas à 4 °C puderam ser consideradas como alimentos de baixa qualidade após 6 dias de armazenamento. As amostras enlatadas mostraram uma contaminação inicial após 4 dias de armazenamento à 22 °C, evidenciando a influência do processamento do alimento para retardar sua

degradação, pois a contaminação começa mais tardiamente em comparação a degradação observada nas amostras frescas. As amostras armazenadas à - 4 °C mantiveram valores considerados indicadores de boa qualidade durante todo o período de armazenamento analisado.

Tabela 3 – Índices para aminas biogênicas calculados conforme IAB_{MK} e IAB_{VN}

Temperatura	22 °C										4 °C			
amostra	atum em água		atum em azeite		sardinha enlatada		sardinha		carne		sardinha		carne	
índice	IAB _{MK}	IAB _{VN}	IAB _{MK}	IAB _{VN}	IAB _{MK}	IAB _{VN}	IAB _{MK}	IAB _{VN}	IAB _{MK}	IAB _{VN}	IAB _{MK}	IAB _{VN}	IAB _{MK}	IAB _{VN}
controle	0,3	1	0,3	2	0,3	1	0,1	0,7	0,2	0,9	0,1	0,7	0,2	0,9
após 8 horas	0,2	0,8	0,2	2	0,4	1	0,4	1	0,6	0,9	0,2	1	0,3	0,5
após 1 dia	0,2	0,8	0,4	2	0,3	1	85	375	2	18	0,3	1	0,1	0,5
após 4 dias	4	14	2	24	2	8	201	925	9	82	0,6	2	0,3	4
após 6 dias	5	21	2	31	2	9	1591	1808	10	134	13	47	1	14
após 7 dias	4	22	2	34	2	9	441	1692	10	168	63	198	2	24

Fonte: Elaborada pela Autora (2019).

4.5.5 Ensaios colorimétricos para determinação de histamina

De forma alternativa, é possível utilizar uma reação específica para determinar um composto específico. A análise colorimétrica foi realizada com o objetivo de determinar histamina.

Similarmente ao método proposto anteriormente, antes da análise colorimétrica, é necessário realizar a extração das aminas das amostras de peixe. Foi verificado a possibilidade de realizar a extração das aminas com uma solução de 0,85 % de NaCl, com posterior extração com butanol, conforme descrito por Patange, Mukundan e Kumar (2005), com pequenas modificações, em comparação com a extração com HCl 1 mol L⁻¹. Com essa finalidade, foram realizados experimentos adicionando 20 mg L⁻¹ de padrões de putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina à 2,0 g de uma amostra de atum enlatado com água. Com os extratos obtidos foi realizado o procedimento de SALLE e as amostras foram analisadas por HPLC. As amostras extraídas com HCl 1 mol L⁻¹ apresentaram os respectivos picos de aminas, enquanto que para as amostras extraídas com 0,85 % de NaCl não foram observados picos no cromatograma. Além disso, esse procedimento apresenta a desvantagem de utilizar butanol, que é um composto classificado como insalubre para se trabalhar. Portanto, o HCl 1 mol L⁻¹ mostrou ser mais adequado para a extração e foi o solvente utilizado para a extração da histamina nas amostras de peixe.

O método colorimétrico utilizado foi proposto por Koessler e Hanke (1919). Na Figura 26 está representada a formação do sal de diazônio, produzido pela reação entre o ácido sulfanílico e solução ácida de nitrito, com formação do sulfonato de *p*-fenildiazônio. O composto produz solução incolor e reage com a posição α ao grupo imidazol do anel, formando um corante azóico que absorve no comprimento de onda de 496 nm. A adição de carbonato é necessária para neutralizar os íons H⁺ formados na última etapa da reação e favorecer o deslocamento do equilíbrio para o produto. A reação ocorre de forma similar para compostos nitrogenados heterocíclicos, como a timina (uma das bases nitrogenadas do DNA) e tiamina (vitamina B1) (PESEZ; POIRIER, 1954).

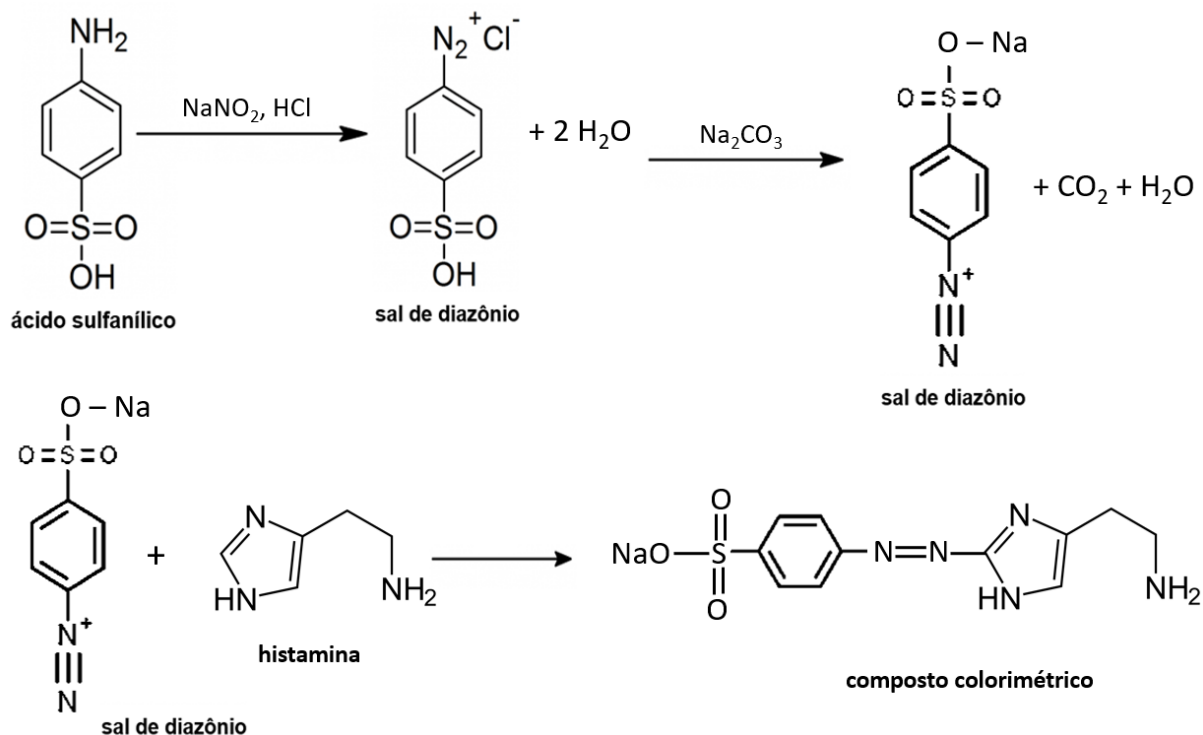


Figura 26 – Formação de sulfonato de *p*-fenildiazônio

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

O tempo necessário para a reação ocorrer foi avaliado pela leitura de soluções preparadas com $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ de histamina e leitura da absorbância após transcorridos 2, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos de reação. Pela Figura 27, é possível observar que houve diminuição da absorbância com o aumento do tempo esperado para realizar a medida no espectrofotômetro. O intervalo de 5 minutos foi estabelecido para as medições, por apresentar valores altos e próximos aos iniciais e por permitir que a operação da leitura da absorbância das soluções pelo equipamento fosse realizada com tranquilidade pelo analista.

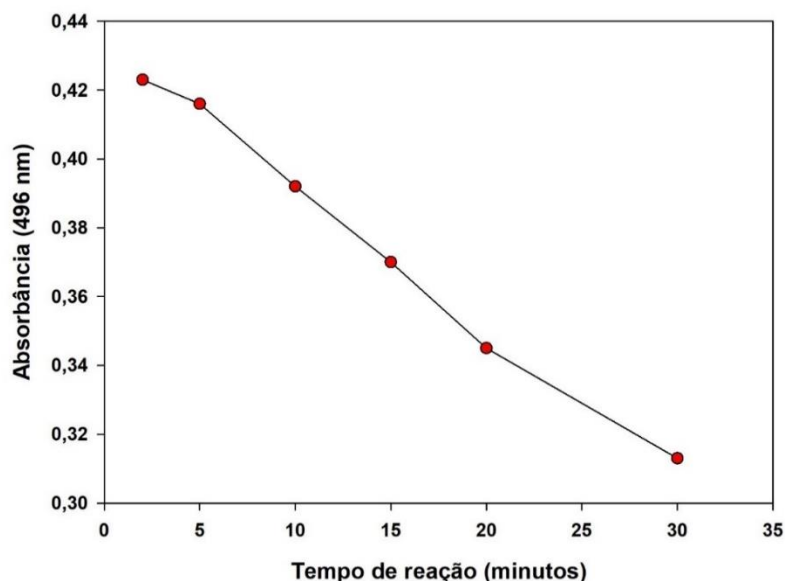


Figura 27 – Relação da absorbância com o tempo de reação entre histamina e sulfonato de *p*-fenildiazônio

Fonte: Elaborada pela Autora (2020).

Com a adição de concentrações conhecidas de padrão de histamina à solução de sulfonato de *p*-fenildiazônio e Na_2CO_3 , ocorreu um aumento na absorção na região de estudo no espectro do visível. O aumento da absorbância foi proporcional à quantidade de histamina adicionada. Entretanto, nas reações realizadas diretamente com amostra de peixe, quando uma alíquota do extrato ácido obtido após a centrifugação com HCl foi utilizada para proceder com a reação colorimétrica com o sulfonato de *p*-fenildiazônio, não foi possível observar formação de coloração na solução, e consequentemente, também não houve um sinal de absorbância nessas soluções na região de estudo (496 nm). O HCl promove a extração não só de amins como também de outros compostos da amostra que, possivelmente, causaram uma interferência na reação e impossibilitaram que a reação colorimétrica acontecesse, diferente do observado com as soluções de padrão de histamina. Para contornar esse problema, após a extração com HCl, foi adicionada uma etapa de extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE), para obter um extrato mais limpo e concentrado do composto de interesse (histamina) e permitir a reação dele com o reagente colorimétrico. A adição dessa etapa de SALLE, foi primordial para que ocorresse um aumento no sinal da absorbância com o aumento da concentração de histamina adicionada nas amostras de peixe e, dessa forma, foi possível construir uma curva com adição de padrão e analisar as amostras de peixe.

A curva de calibração e a curva com adição de padrão relativas ao sinal observado para diferentes concentrações de histamina está representada na Figura 28. A equação linear da reta obtida pela curva de calibração foi $A_p = 6,38 \times 10^{-3} \pm 2,31 \times 10^{-5} [\text{HIS}] - 5,07 \times 10^{-3} \pm 1,03 \times 10^{-3}$, sendo A_p é absorbância medida com soluções padrões, e o coeficiente de correlação foi igual a 0,9999, mostrando uma excelente linearidade para a reação. Uma curva com adição de padrão foi construída para verificar a interferência da matriz nas análises, com alíquotas de solução padrão, nas mesmas concentrações da curva de calibração, adicionadas às amostras de peixe e submetidas ao procedimento de extração. A equação de reta obtida para a curva com adição de padrão foi $y A_{ap} = 5,04 \times 10^{-3} \pm 7,37 \times 10^{-5} [\text{HIS}] + 2,41 \times 10^{-2} \pm 3,29 \times 10^{-3}$, sendo A_{ap} é absorbância medida com adições de padrões, e o coeficiente de determinação foi igual a 0,9991. A análise estatística feita para as duas curvas (conforme descrito na seção 2.2) mostrou que a inclinação da curva com adição de padrão e da curva de calibração são estatisticamente diferentes (teste t de *Sudent*, com intervalo de 95 % de confiança) e, portanto, a curva com adição de padrão deve ser utilizada para a quantificação das amostras.

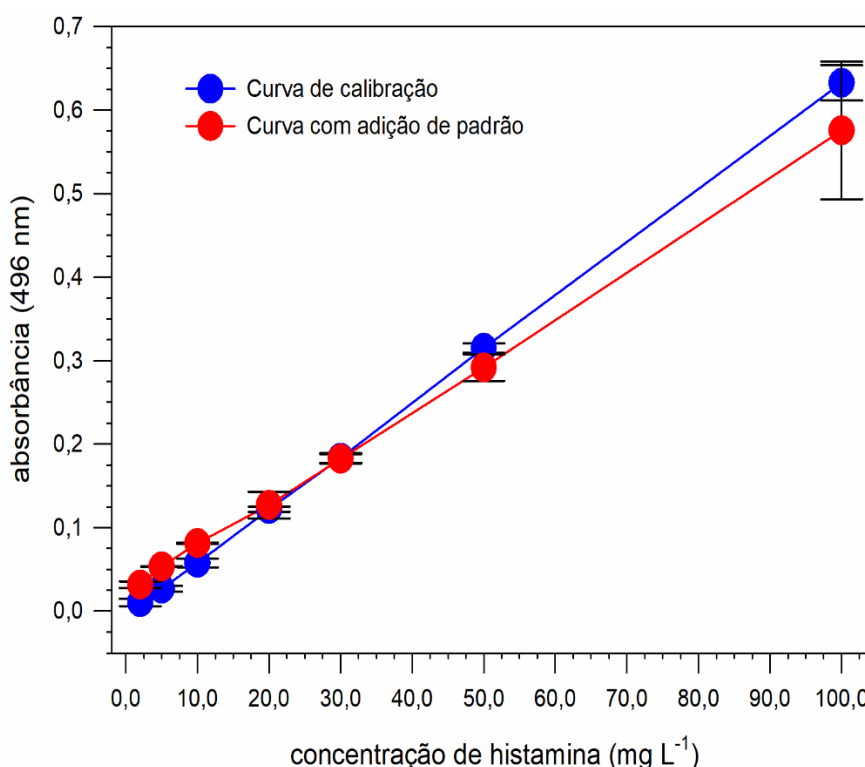


Figura 28 – Curva de calibração e curva com adição de padrão obtidas da reação de histamina com sulfonato de *p*-fenildiazônio

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Os limites de detecção e quantificação para a reação colorimétrica foram de 2,44 e 7,4 mg L⁻¹, respectivamente, que correspondem a 24,4 e 74,0 mg kg⁻¹. A repetibilidade do método foi obtida pela análise, no mesmo dia, de 6 réplicas de amostras em que foram adicionadas solução padrão com concentrações de 5,0 e 50,0 mg L⁻¹, e foram iguais a 8 % e 7 %, respectivamente. Os valores encontrados para reprodutibilidade foram de 11 % e 10 %, respectivamente. A recuperação foi determinada para as concentrações de padrões de 5,0; 20,0 e 50,0 mg L⁻¹ e foram obtidas recuperações médias de 89 %, 107 % e 109 %, respectivamente. O equilíbrio estabelecido depende da razão de partição descrito pela equação 7.

$$K = \frac{[A]_{fase\ 2}}{[A]_{fase\ 1}} \quad (7)$$

Sendo $[A]_{fase\ 2}$ a concentração do analito na fase 2 (acetonitrila), e $[A]_{fase\ 1}$ a concentração do analito na fase 1 (solução ácida). Dessa forma, a razão de partição (K) poderá variar dependendo da quantidade de analito total.

Cadaverina, tiramina e putrescina em concentração de 20,0 mg L⁻¹ foram avaliadas como possíveis interferentes para a reação. Só foi possível verificar uma pequena alteração na coloração da solução com a tiramina, porém a absorbância medida esteve abaixo do limite de detecção. Portanto, o método é seletivo apenas para a histamina, quando consideradas outras aminas usualmente encontradas neste tipo de amostra analisada.

Os parâmetros analíticos obtidos comprovam que o método proposto é eficaz para a determinação de histamina e pode ser aplicado em matrizes alimentares. Foram analisadas amostras de atum enlatado armazenado em óleo, em água e em molho de tomate, atum defumado e sardinha em lata. A amostra de atum defumado apresentou concentração de histamina de 32,78 (4,73) mg kg⁻¹ e no atum enlatado com óleo a concentração de histamina encontrada foi de 19,12 (1,83) mg kg⁻¹. Nas demais amostras analisadas a histamina não foi detectada.

O método que utiliza extração por SALLE e detecção por HPLC-UV foi utilizado para otimizar as condições de extração da amostra e comparar os resultados obtidos pelo método colorimétrico. As análises colorimétricas permitem fazer uma triagem das amostras, para identificar a presença de histamina e auxiliar na seleção de amostras que devem ser alvo de uma análise mais minuciosa para

confirmar as concentrações de histamina e verificar a presença concomitante de outras ABs na amostra. A adoção dessa etapa pode ser vantajosa por análises espectrofotométricas serem mais rápidas e possuírem um menor custo em comparação ao HPLC.

4.6 Conclusões

O potencial da técnica SALLE para uso na determinação de aminas biogênicas em produtos alimentares foi aqui demonstrado. A SALLE permite análises simples e resultados confiáveis, entre algumas vantagens permite que as etapas de derivatização e extração sejam realizadas simultaneamente. As condições utilizadas no procedimento de extração por SALLE, como pH, adição de sal, e privação de luz favorecem a reação entre o reagente de derivatização (DNS-Cl) e as aminas, evitando o uso de aquecimento e longos períodos para que a reação de derivatização seja completada. Os parâmetros de validação do método mostraram que a identificação e quantificação das onze aminas biogênicas avaliadas poderiam ser realizadas com confiança em matrizes complexas. Nos ensaios de degradação forçada, foi observado que concentrações de algumas aminas biogênicas aumentaram com o progresso do tempo de armazenamento da amostra e sob condições de temperaturas mais elevadas. O aumento na concentração de aminas biogênicas foi maior e mais rápido para amostras armazenadas sob 22 °C em comparação com as amostras armazenadas à - 4 °C e 4 °C, quando a concentração da maioria das aminas permaneceu inalterada ou sofreu variações pequenas. Portanto, o armazenamento sob condições de baixa temperatura pareceu efetivamente retardar a formação de aminas biogênicas nas amostras. A técnica SALLE também mostrou ser uma forma eficiente para isolamento e extração de histamina para análise colorimétrica de amostras de alimentos. Os resultados demonstram que a SALLE permite a análise de aminas biogênicas em produtos alimentares com diferentes composições de matérias-primas e submetidos à diferentes tipos de processamentos. Essa técnica pode ser utilizada para auxiliar na avaliação da qualidade de alimentos através da verificação do conteúdo de ABs presentes.

5 CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE ALDEÍDOS VOLÁTEIS DE AMOSTRAS DE CAFÉ POR MICROEXTRAÇÃO POR DIFUSÃO GASOSA (GDME) E SALLE

Neste Capítulo é descrito o procedimento analítico proposto para determinação de aldeídos voláteis em cafés utilizando SALLE e GDME para extração dos analitos. Uma introdução sobre aldeídos em amostras de alimentos, métodos analíticos para determinação desses compostos e sobre a técnica GDME também são apresentados.

5.1 Introdução

O aroma é uma das principais características do alimento avaliadas pelos consumidores e um parâmetro essencial para sua classificação dentro do contexto de qualidade alimentar (RUOSI *et al.*, 2012). O café é conhecido como um dos mais aromáticos alimentos, e a satisfação sensorial que os seus componentes voláteis proporcionam está estritamente relacionada ao seu consumo. Mais de 900 compostos voláteis já foram descritos para o café e contribuem para seu aroma (TOLEDO *et al.*, 2016). Informações sobre a composição química da fração volátil do café permitem fazer uma distinção entre as variedades de espécies de café cultivadas, o clima e o solo da região geográfica de origem das sementes, defeitos existentes nas sementes e ainda quais foram as condições dos procedimentos de torrefação, fermentação e armazenamento adotados. Portanto, a análise da composição volátil do café ajuda a descrever características relacionadas à diferentes aspectos da qualidade desse produto (TOCI; FARAH, 2014; TOLEDO *et al.*, 2016).

Aldeídos são alguns dos compostos que têm sido relacionados com características organolépticas e aspectos de qualidade dos cafés (MARIN *et al.*, 2008; RUOSI *et al.*, 2012; TOCI; FARAH, 2014; YANG *et al.*, 2016). Aldeídos de cadeia curta, por exemplo, tem notas de aroma acre e pungente e são indesejáveis em concentrações elevadas, enquanto, inversamente, aldeídos de cadeia longa tipicamente exibem agradáveis aromas de frutas e flores (TOCI; FARAH, 2014). A torrefação é uma das etapas de produção do café que influencia na formação de aldeídos com efeitos no seu aroma (LEE *et al.*, 2017). Uma torrefação leve produz

furfural (2-FAL), que contribui com notas de amêndoa doce, e 5-metilbutanal, que contribui com notas amanteigadas (TOLEDO *et al.*, 2016). A presença de acetaldeído (AA) em café também já foi relacionada à características organolépticas positivas e considerada responsável pela composição de parte de seu aroma final (MARIN *et al.*, 2008). As concentrações de 2-FAL e 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) aumentaram com a intensidade da torrefação, indicando a importância desse parâmetro para a formação da composição volátil do café e, conseqüentemente, para seu aroma e sabor (PETISCA *et al.*, 2013). A razão entre 5-metilfurfural e 2-acetilfurano já foi proposta como um índice químico para monitorar a torrefação do café (RUOSI *et al.*, 2012) e o 2-FAL apareceu em concentrações menores em casos de torrefação mal conduzida em comparação com uma torrefação normal (YANG *et al.*, 2016). 2-FAL também foi usado para diferenciação de procedimentos de fermentação em sementes de café (CHAICHI *et al.*, 2015).

A concentração de aldeídos pode ainda ser utilizada para auxiliar na identificação de origens geográficas e para fazer uma distinção das sementes do café (CHEONG *et al.*, 2013). Espécies de café arábica cultivadas em El Salvador foram diferenciadas pelas altas concentrações de 2-FAL, 2-metilbutanal e 3-metilbutanal (TOLEDO *et al.*, 2016). Já benzaldeído e hexanal foram sugeridos como potenciais marcadores para identificar sementes defeituosas (MANCHA AGRESTI *et al.*, 2008; TOCI; FARAH, 2008, 2014).

A formação de aldeídos nos alimentos ocorre, principalmente, pela da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, que são compostos presentes em quantidade considerável em diferentes tipos de alimentos, entre eles o café. Ácido linoleico, por exemplo, é um dos principais ácidos graxos presentes no café e tem o hexanal como produto de oxidação. Quanto mais tempo o café fica exposto ao oxigênio, mais ocorre oxidação de ácido linoleico e um aumento na concentração de hexanal é observado. Já para outros aldeídos, como 3-metilbutanal e 2-metilpropanal, a diminuição da quantidade indica uma perda da qualidade. Por essa razão, esses aldeídos foram propostos como indicadores das condições de armazenamento do café (MARIN *et al.*, 2008).

A avaliação sistemática de compostos voláteis e não-voláteis do café que afetam diretamente a sua qualidade em termos de aroma, sabor e valor nutricional é de extrema importância. Entretanto, a exploração de aldeídos em matrizes de café ainda é escassa e, mais usualmente, a análise desses compostos é realizada por

SPME-GC-MS. Nesse trabalho, a técnica de microextração por difusão gasosa (GDME) foi proposta para separação dos aldeídos voláteis do café. Após extração dos compostos voláteis por GDME, foi realizada uma SALLE no extrato líquido e ambas as técnicas possibilitaram potencializar a extração dos analitos, que foi avaliada pela análise por HPLC-UV.

A revisão bibliográfica desse Capítulo compreende informações a respeito dos aldeídos em algumas matrizes alimentares, efeitos toxicológicos à saúde humana e métodos analíticos para sua determinação. A técnica de tratamento de amostra GDME foi aqui enfatizada por se referir diretamente a uma etapa do desenvolvimento do método analítico proposto nesse Capítulo.

5.2 Revisão Bibliográfica

Aldeídos são compostos orgânicos caracterizados pela presença de uma ligação dupla entre carbono e oxigênio. Esses compostos estão amplamente presentes em diferentes meios e são reconhecidos como muito reativos e capazes de causar efeitos adversos à saúde humana, por isso tem relevância para as áreas clínicas, biológicas, ambientais e para ciências de alimentos (KISHIKAWA; EL-MAGHRABEY; KURODA, 2019; PASTOR-BELDA *et al.*, 2017; PRIETO-BLANCO *et al.*, 2010; SERRANO; GALLEGO; SILVA, 2017a; XU *et al.*, 2010, 2011).

Nos alimentos, os aldeídos são formados por diferentes vias, durante a degradação, como subprodutos no processo de maturação, quando os alimentos são submetidos a temperaturas elevadas ou à fermentação microbiana e quando ocorre oxidação. A oxidação de ácidos graxos poli-insaturados é uma das principais vias de formação de aldeídos em alimentos. A oxidação dos lipídios ocorre em duas etapas, onde, primeiramente, são formados hidroperóxidos e, depois, compostos voláteis, porém em menor extensão. A degradação de Strecker de aminoácidos e reações de Maillard também são vias de formação de aldeídos. No geral, alimentos que contêm alto teor de monossacarídeos e dissacarídeos, proteínas, aminoácidos e lipídios com alto grau de insaturação, estão susceptíveis a gerar aldeídos após serem expostos a altas temperaturas (RIZZI, 2006).

A quantidade e variedade de aldeídos em amostras de alimentos podem ser usadas como indicadores para avaliar a qualidade do alimento e dos procedimentos a que ele foi submetido (KISHIKAWA; EL-MAGHRABEY; KURODA, 2019). Aldeídos

alifáticos, principalmente FA, AA, e gliceraldeído já foram extensivamente investigados em bebidas alcoólicas (ELIAS *et al.*, 2008). Existe uma forte relação entre o envelhecimento do vinho e as concentrações de aldeídos como 2-FAL, HMF, 5-metil-2-furfural e 5-etoximetil-2-furfural (CÂMARA; ALVES; MARQUES, 2006). Foi demonstrado também que o conteúdo de aldeídos em vinhos tintos é maior do que em vinhos brancos (KISHIKAWA; EL-MAGHRABEY; KURODA, 2019). Um aumento na concentração de metilbutanal foi observado com o envelhecimento da cerveja (VANDERHAEGEN *et al.*, 2006). Já propionaldeído, valeraldeído e banzaldeído foram sugeridos como indicadores de adulteração em bebidas (SERRANO; GALLEGU; SILVA, 2017a). Em óleos, malondialdeído é um dos principais compostos determinados, junto com AA, FA, acroleína, propanodial, propanal e pentanal (CUSTODIO-MENDOZA *et al.*, 2019, 2020; DOUNY *et al.*, 2015; MA; LIU, 2017). Estudos demonstraram que a concentração de aldeídos em óleo vegetal aumentou com a oxidação térmica e que podem ser usados como índice para monitorar a deterioração de lipídios (CUSTODIO-MENDOZA *et al.*, 2019; DOUNY *et al.*, 2015; MA; LIU, 2017; SHIBAMOTO, 2006).

Além dos aspectos relacionados à qualidade do alimento, muitos aldeídos já foram apontados como causadores de efeitos adversos à saúde humana. Um dos aldeídos mais estudados é o malondialdeído, pois sua interação com DNA já foi demonstrada como potencialmente mutagênica (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005; MA; LIU, 2017). A acroleína pode ser formada pela degradação térmica de gorduras animais e vegetais, de carboidratos e de aminoácidos em diferentes tipos de alimentos. É um composto considerado citotóxico, pode interferir na síntese de proteínas e DNA e já teve efeitos mutagênicos demonstrados (ABRAHAM *et al.*, 2011). Propanodial causa estresse oxidativo nas células, forma adutos com ácidos nucleicos, que podem desencadear danos nos tecidos, além de apresentar potencial atividade citotóxica, que pode levar a mutações e câncer (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). Glioxal e metilglioxal também já foram correlacionados com diabetes e risco de câncer (PASTOR-BELDA *et al.*, 2017; SHIBAMOTO, 2006).

A análise de aldeídos em amostras de alimentos geralmente é executada a fim de monitorar aspectos de sua qualidade, mas também é importante que um rastreio dos níveis de aldeídos em diferentes alimentos e bebidas seja feito para poder estimar os possíveis efeitos adversos à saúde humana que sua ingestão pode

causar (PAIANO *et al.*, 2014). Muitos métodos para a determinação analítica de aldeídos são apresentados na literatura, uma vez que sua presença pode se estender a diferentes tipos de amostras, como resultado de sua vasta formação em reações secundárias (KISHIKAWA; EL-MAGHRABEY; KURODA, 2019).

5.2.1 Acetaldeído, formaldeído e 2-furfural em alimentos

Acetaldeído (AA), ou etanal, é um aldeído de baixa massa molecular e altamente volátil. AA está naturalmente presente em frutas, vegetais, carne, peixe, leites e derivados. Na indústria de alimentos, AA é adicionado à diversas bebidas e outros produtos como um realçador de sabor ou conservante (PAIANO *et al.*, 2014). AA também é um produto natural da fermentação alcoólica de frutas e do metabolismo do açúcar. Também pode ser formado pela degradação de Strecker da alanina. Além disso, AA é formado como um produto secundário da oxidação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados, pela fermentação de bactérias ácido lácticas no vinho e pelo metabolismo de etanol e compostos fenólicos (JUNG *et al.*, 2021).

A principal via de exposição humana à AA é o consumo de bebidas alcoólicas, seguido por fumaça de cigarro e pelos alimentos em que ele é adicionado. Outra via de exposição importante em alimentos pode ser a liberação de tereftalato de polietileno (PET) em embalagens de alimentos e garrafas de bebidas (PAIANO *et al.*, 2014).

Já foi demonstrada a contribuição que os níveis de AA desempenham para a modulação do aroma do vinho, sendo que em níveis baixos contribui com notas florais e frutíferas positivas, enquanto que em níveis mais elevados influencia nos efeitos negativos, aumentando as chamadas notas de “vegetais verdes”, as sensações de coceira e de queimação (ARIAS-PÉREZ *et al.*, 2021). Os níveis de AA podem interferir no processo de envelhecimento do vinho, promovendo alterações na sua coloração (HAN; WEBB; WATERHOUSE, 2019). AA foi também um dos primeiros compostos a aumentar de concentração em cervejas envelhecidas e a apresenta alta influencia no aroma dessa bebida (VANDERHAEGEN *et al.*, 2006, 2007).

No vinho, a formação de AA ocorre, principalmente, devido à fermentação, como um intermediário da produção de etanol. Mas também pode ser formado por oxidação de etanol na presença de catalisador, sendo que essa reação está sujeita

a ocorrer durante todo o processo de produção do vinho (ARIAS-PÉREZ *et al.*, 2021). Os níveis de AA variam consideravelmente dependendo das condições de fermentação, como temperatura, níveis de O₂, pH e disponibilidade de nutrientes para a levedura (HAN; WEBB; WATERHOUSE, 2019; PAIANO *et al.*, 2014). No café, a fermentação também influencia a concentração de AA, que tende a ter os seus níveis elevados durante a fermentação das sementes (PEREIRA *et al.*, 2014).

AA foi detectado em diversos vegetais enlatados com maior concentração de 89 µg kg⁻¹ em ervilhas (SERRANO; GALLEG0; SILVA, 2017b). A análise de AA em diversas matrizes alimentares indicou os maiores valores em café em pó (20,1 µg g⁻¹) e yogurt (6,98 µg g⁻¹) (JEONG *et al.*, 2015). A verificação do efeito de alguns tipos de cozimento dos alimentos para a formação ou eliminação de AA mostrou que a fervura diminuiu a concentração de AA de 2,94 para 0,34 µg g⁻¹ na costela de boi, porém aumentou a concentração de AA em ovos (JUNG *et al.*, 2021). A fritura também aumentou a concentração de AA em ovos, que passou de não detectado no ovo cru para concentração de 0,52 µg g⁻¹ depois de frito (JUNG *et al.*, 2021). Na carne de porco, a fritura também causou a maior concentração observada para o AA, de 1,55 µg g⁻¹ (JUNG *et al.*, 2021). Concentração de AA em suco de laranja foi determinada em 142 µg L⁻¹ (SERRANO; GALLEG0; SILVA, 2017b) e em óleos de cozinha variaram de 0,4 a 0,6 µg g⁻¹ (CUSTODIO-MENDOZA *et al.*, 2020). AA foi determinado em vinho com concentrações médias de 30 mg L⁻¹ (ELIAS *et al.*, 2008), de 88 mg L⁻¹ e entre 15,6 e 117 mg L⁻¹ em vinho do Porto (CÂMARA; ALVES; MARQUES, 2006; PAIANO *et al.*, 2014) e de 56,8 mg L⁻¹ em cachaça; em amostras de lic0res, vinho, cerveja e gin, foram obtidas concentrações de AA de 1850, 477, 15 e 1,90 mg L⁻¹, respectivamente (PAIANO *et al.*, 2014).

Formaldeído (FA), ou metanal, também é um aldeído de baixa massa molecular e altamente volátil. Está naturalmente presente em alimentos como frutas, vegetais, leite, carnes, peixes e crustáceos. Em frutas e vegetais, FA é formado como um produto intermediário do metabolismo natural. Nos peixes e frutos do mar, o FA é produzido, principalmente, pela decomposição enzimática de trimetilaminaoxidase (TMAO). Degradação de Strecker de glicina e oxidação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados também são vias de formação de FA (JUNG *et al.*, 2021). Além disso, o FA é utilizado na indústria de alimentos como conservante, agente redutor, fumegante ou agente esterilizante em diversos tipos de alimentos (JUNG *et al.*, 2021; SERRANO; GALLEG0; SILVA, 2017a). Entretanto, também é

ilegalmente utilizado para adulteração em processos industriais, pois proporciona um aumento no período de armazenamento do alimento, além de causar uma alteração em suas propriedades organolépticas, tornando-o mais atrativo ao consumidor (NOWSHAD; ISLAM; KHAN, 2018; REZENDE *et al.*, 2017; TEMEL; GÜRKAN, 2017).

Temel e Gürkan (2017) reportaram concentrações de $5,6 \mu\text{g L}^{-1}$ de FA em vinho branco, $8,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em vinho tinto, $12,8 \mu\text{g L}^{-1}$ em vinagre de maçã, $11,7 \mu\text{g L}^{-1}$ em leite e $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ em cerveja. FA foi detectado com concentração média de 5 mg L^{-1} em leite, 20 mg kg^{-1} em banana, 58 mg L^{-1} em laranja, 8 mg kg^{-1} em carne e 9 mg kg^{-1} em café (NOWSHAD; ISLAM; KHAN, 2018). Concentração de FA de 862 mg L^{-1} foi reportada para a lula (TAPRAB; SAMEENOI, 2019). FA foi determinado em concentração de $0,17 \text{ mg L}^{-1}$ em vinho do Porto e de $6,4 \text{ mg L}^{-1}$ em cachaça. FA também foi detectado em vegetais enlatados, com maior concentração de $95 \mu\text{g kg}^{-1}$ em beterraba (SERRANO; GALLEGOS; SILVA, 2017b); em leite, com concentrações que variaram de não detectado à $55 \mu\text{g L}^{-1}$ (REZENDE *et al.*, 2017); e em suco de laranja, com $28 \mu\text{g L}^{-1}$ (SERRANO; GALLEGOS; SILVA, 2017a). Jeong *et al.* (2015) determinaram FA em diversas matrizes alimentares e encontraram os maiores valores para vinho branco ($40,6 \mu\text{g g}^{-1}$) e café instantâneo ($1,52 \mu\text{g g}^{-1}$). A fritura diminuiu o teor de FA no ovo de 0,22 para $0,09 \mu\text{g g}^{-1}$, enquanto aumentou a concentração no óleo e em carne de porco ($0,32 \mu\text{g g}^{-1}$) (JUNG *et al.*, 2021). Já o processo de cozimento diminuiu a concentração de FA de 0,65 para $0,08 \mu\text{g g}^{-1}$ na costela de boi. Concentrações de FA variaram de 0,4 a $0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ em óleos de cozinha (CUSTODIO-MENDOZA *et al.*, 2020). FA foi encontrado em concentração de 21 à 150 mg kg^{-1} em peixes (WAHED *et al.*, 2016).

O 2-furfural (2-FAL), também com os nomes de furano-2-carboxaldeído, ou 2-furfuraldeído, é um aldeído heterocíclico formado principalmente como um intermediário das reações de Maillard (VANDERHAEGEN *et al.*, 2007). 2-FAL já foi detectado em muitos produtos alimentares, tanto industriais quanto nos preparados à nível doméstico, incluindo derivados de cereais, sucos de fruta, mel, vinho, cerveja, leite e café (ABU-BAKAR; MAKAHLEH; SAAD, 2014; CÂMARA; ALVES; MARQUES, 2006; CHAICHI *et al.*, 2015; PETISCA *et al.*, 2014; QUARTA; ANESE, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2012; VANDERHAEGEN *et al.*, 2007). 2-FAL é considerado um marcador analítico importante no processo de envelhecimento de cerveja e vinho, aumentando quase que linearmente com o seu envelhecimento (CÂMARA;

ALVES; MARQUES, 2006; VANDERHAEGEN *et al.*, 2007). Também está relacionado com alteração de coloração da cerveja (VANDERHAEGEN *et al.*, 2006). 2-FAL também é considerado como um marcador positivo de qualidade do café, sendo que tratamentos que tentaram removê-lo resultaram em uma diminuição significativa da intensidade aromática (QUARTA; ANESE, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2009, 2012).

Chaichi *et al.* (2015) encontraram concentração de 2-FAL na faixa de 1 à 20 mg kg⁻¹ em amostras de café instantâneo e em pó. Análises entre pães e produtos de padaria detectaram 2-FAL em menor concentração em bolo, de 1,9 mg kg⁻¹, e em maior concentração em pão, com 5,3 mg kg⁻¹ (PETISCA *et al.*, 2014). Em chocolate, 2-FAL foi detectado com concentração de 20 mg kg⁻¹ (PETISCA *et al.*, 2014). Entre algumas bebidas, 2-FAL foi determinado em concentração de 0,95 mg por 100 mL de álcool em tequila (RAMÍREZ-GUÍZAR *et al.*, 2020), em concentração de 3,5 mg por 100 mL de álcool em cachaça (FRANCO; SUAREZ; DOS SANTOS, 2017), em concentrações de 0,12 a 6,13 mg L⁻¹ em amostras de suco de maçã (ABU-BAKAR; MAKAHLEH; SAAD, 2014) e entre 0,2 e 24 mg L⁻¹ em vinho (CÂMARA; ALVES; MARQUES, 2006; PEREIRA *et al.*, 2011).

5.2.2 Efeitos de acetaldeído, formaldeído e 2-furfural na saúde humana

A presença de aldeídos pode conferir sabor agradável e aspecto atraente aos alimentos, no entanto, em elevadas quantidades, aldeídos podem causar efeitos adversos à saúde humana (KISHIKAWA; EL-MAGHRABEY; KURODA, 2019). As pessoas podem estar expostas à consideráveis quantidades de aldeídos provenientes de diferentes fontes alimentares, uma vez que eles estão amplamente presentes em alimentos e bebidas. Entretanto, poucas informações a respeito do potencial impacto que o consumo de aldeídos em produtos alimentares podem ter para a saúde pública estão disponíveis (PAIANO *et al.*, 2014).

Após consumido, o etanol é metabolizado no fígado à AA e, em seguida, à acetato, pela álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH), respectivamente (PAIANO *et al.*, 2014). Essa reação geralmente ocorre rapidamente, porém, ainda assim, o consumo de álcool aumenta a concentração de AA no organismo humano. Estudos epidemiológicos sugeriram que o AA, tanto presente em bebidas alcoólicas ou formado endogenamente a partir da oxidação do

etanol pela microflora oral, é um carcinogênico, especialmente para a cavidade oral, o esôfago e o trato digestivo superior (SALASPURO, 2011). Além disso, experimentos mostraram sua capacidade de formar ligações covalentes com o DNA, induzir danos à reparação celular e causar mutações (JUNG *et al.*, 2021; PAIANO *et al.*, 2014). Pessoas com deficiência de aldeído desidrogenase mostraram ter maiores níveis de AA em seu sangue e urina, e mesmo adutos de DNA associados ao AA em seus linfócitos, portanto, alguns indivíduos estão ainda mais susceptíveis aos efeitos adversos do AA (PAIANO *et al.*, 2014).

Estudos quantitativos da avaliação de risco para AA em bebidas alcoólicas, usando a abordagem da Agência de Segurança Alimentar Europeia (EFSA, do inglês *European Food Safety Agency*), concluíram que o consumo de álcool é uma fonte de exposição direta à AA e, em conjunto com outras fontes de AA, resulta em um risco de câncer que requer atenção (PAIANO *et al.*, 2014). A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer*) classifica o AA como possivelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2B) e como carcinogênico para humanos (Grupo 1) quando o AA é associado ao consumo de bebidas alcoólicas (JUNG *et al.*, 2021).

O FA pode causar efeitos adversos à saúde humana que variam de irritação dos olhos e do trato respiratório superior, dor de cabeça, náuseas, sonolência e reações alérgicas na pele. Além disso, testes animais demonstraram que o FA é um potencial agente mutagênico e carcinogênico (TEMEL; GÜRKAN, 2017). O consumo de FA também está relacionado a um aumento no risco de leucemia e de câncer na nasofaringe e esse composto é classificado como carcinogênico para humanos (Grupo 1) pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer*) (JUNG *et al.*, 2021).

O 2-FAL é irritante para os olhos, pele e trato respiratório. Ele tem uma dose letal mediana (LD₅₀) para ratos entre 50 e 127 mg kg⁻¹ (ANESE; SUMAN, 2013), o que o classifica como um composto bastante tóxico. Ele também é carcinogênico para animais, porém com relevância desconhecida para humanos (A3) (ABRAHAM *et al.*, 2011). A *European Food Safety Authority* indica um valor máximo de consumo de 0,5 mg por kg de peso corporal de 2-FAL (EFSA, 2005).

5.2.3 Limites regulatórios para aldeídos em alimentos

Limites regulatórios estabelecem uma quantidade máxima de AA em bebidas alcoólicas de 100 mg por 100 mL de álcool, porém a quantidade de AA encontrado nos alimentos indica que esse valor está muito alto para proteger adequadamente a saúde humana (PAIANO *et al.*, 2014). Estudos que avaliaram o potencial risco de câncer da população italiana em relação a exposição à AA em diferentes bebidas alcoólicas e não alcoólicas determinaram a margem de exposição mais baixa para grandes consumidores de vinho (69 mg por 100 mL de álcool) e sugeriu que medidas regulatórias e orientações ao consumidor são necessárias para reduzir a quantidade de AA em alimentos e bebidas para os menores valores que tecnologicamente forem possíveis de alcançar. Além disso, o AA é classificado pela FDA como “geralmente reconhecido como seguro”, o que permite que seja utilizado como aditivo alimentar, entretanto, já foi sugerido que essa classificação deveria ser reavaliada e atualizada com base nas novas evidências a respeito dos potenciais riscos do AA à saúde (PAIANO *et al.*, 2014).

Não existe um padrão estabelecido para a ingestão diária aceitável de FA, entretanto, a European Food Safety Authority (2014) estima que a exposição total de FA na dieta não deve exceder 100 mg por dia. Devido aos impactos negativos à saúde humana, a Comunidade Europeia estabeleceu um limite de 15 mg kg⁻¹ para a migração de FA de embalagens de plásticos que fiquem em contato com o alimento (TEMEL; GÜRKAN, 2017).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) através do Programa Internacional de Segurança Química estabelece uma ingestão diária confiável de 260 mg L⁻¹ de FA (WHO, 2002).

5.2.4 Métodos empregados para a análise de aldeídos

Para a determinação de aldeídos em matrizes alimentares, ambientais e biológicas, as técnicas cromatográficas de análise são as que mais se destacam, especialmente por serem adequadas a determinação simultânea de uma grande variedade de compostos (KISHIKAWA; EL-MAGHRABEY; KURODA, 2019). Entre as técnicas cromatográficas, HPLC acopladas à detectores UV, FL e MS é frequentemente utilizada para a análise de aldeídos (BASHEER *et al.*, 2010;

CORDEIRO *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2010; MA; LIU, 2017; REZENDE *et al.*, 2017; WAHED *et al.*, 2016).

No geral, os aldeídos não possuem grupo cromóforo que permita sua determinação pelos detectores empregados, portanto, reações de derivatização são frequentemente aplicadas antes da análise. Embora alguns aldeídos aromáticos possam ser determinados por HPLC-UV sem precisar de uma reação de derivatização, essa reação não só possibilita ou aumenta a sensibilidade, como pode também aumentar a estabilidade e o controle do comportamento de retenção dos aldeídos na coluna do HPLC (KISHIKAWA; EL-MAGHRABEY; KURODA, 2019).

Reagentes derivatizantes baseados em hidrazina têm sido amplamente usados para promover modificações químicas de aldeídos e compostos carbonílicos. Entre eles, a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), também conhecida como reagente de Brady, é o reagente de derivatização mais popular para análises de aldeídos por HPLC-UV (ZHIAN *et al.*, 2018). Esse reagente é frequentemente escolhido devido à grande variedade de compostos para os quais pode ser usado, ao seu baixo custo e à considerável estabilidade dos produtos de reação que são formados (GONÇALVES *et al.*, 2010; ZHIAN *et al.*, 2018). A formação de aldeídos derivatizados com DNPH ocorre conforme ilustrado na Figura 29. O grupo carbonila dos aldeídos reage com um grupo amina do DNPH sob condições ácidas, formando o agente derivatizante 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona). O derivatizado resultante provoca um aumento no coeficiente de absorção UV e melhora a retenção hidrofóbica dos analitos na coluna cromatográfica (LIN *et al.*, 2009).

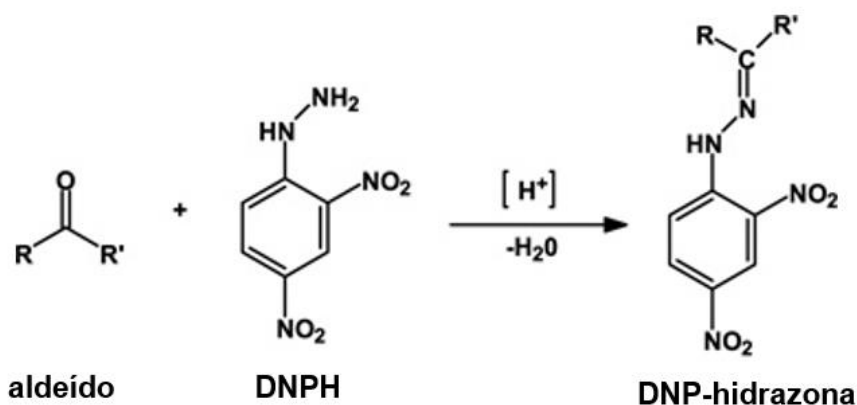


Figura 29 – Reação de derivatização entre DNPH e aldeídos

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Ácido 4-hidrazinobenzóico e benzidrazida também foram usados recentemente para a derivatização de aldeídos e detecção por UV a fim de melhorar a solubilidade do reagente em água (KISHIKAWA; EL-MAGHRABEY; KURODA, 2019).

Embora seja uma técnica amplamente aplicada, algumas desvantagens relacionadas ao HPLC-UV já foram reportadas, entre elas a baixa sensibilidade da detecção UV e problemas de co-eluição de compostos, que podem interferir na determinação do analito de interesse. Detectores fluorimétricos (FL) são mais sensíveis e seletivos do que os detectores UV, e muitos reagentes de derivatização para converter aldeídos não-fluorescentes em seus respectivos derivatizados fluorescentes também estão disponíveis. Assim como no caso da derivatização para detecção por UV, agentes que contêm o grupo hidrazina são os derivatizantes mais empregados para análise de aldeídos por HPLC-FL (PRIETO-BLANCO *et al.*, 2010). Entre eles a hidrazina dansila (DNSH) (PEREIRA; CARRILHO; TAVARES, 2002), 4-(*N,N*-dimetilamino sulfonil)-7-hidrazino-2,1,3-benzoxadiazol (DBD-H) (IMAZATO *et al.*, 2014), DBCEEC (YOU *et al.*, 2009) e BODIPY-aminozida são alguns dos reportados para essas análises (XIONG *et al.*, 2010).

GC, especialmente quando acoplada a MS, também é amplamente utilizada para determinações cromatográficas de aldeídos (ARIAS-PÉREZ *et al.*, 2021; CHAICHI *et al.*, 2015; CUSTODIO-MENDOZA *et al.*, 2020; PASTOR-BELDA *et al.*, 2017). No caso de aldeídos voláteis, podem ser realizadas análises diretas da amostra pelo GC, sem necessidade de uma reação de derivatização (ARIAS-PÉREZ *et al.*, 2021; RAMÍREZ-GUÍZAR *et al.*, 2020). Entretanto, ainda é preferível realizar uma reação de derivatização a fim de melhorar a estabilidade, volatilidade e eficiência de ionização dos aldeídos na análise por GC-MS (JEONG *et al.*, 2015; JUNG *et al.*, 2021; PASTOR-BELDA *et al.*, 2017; WEI *et al.*, 2019). Reagentes com grupo hidrazina também são utilizados para derivatização dos aldeídos para análise por GC. Embora DNPH também possa ser usado para análise por essa técnica cromatográfica, a baixa volatilização e estabilidade térmica dos derivatizados sugerem que ele não é adequado para as análises por GC (KISHIKAWA; EL-MAGHRABEY; KURODA, 2019; SHIBAMOTO, 2006).

5.2.5 Técnicas de tratamento de amostras para análise de aldeídos

Muito frequentemente, a extração de aldeídos das amostras é realizada utilizando SPME e suas variações, principalmente *headspace solid phase microextraction* (HS-SPME), como técnica de tratamento de amostra previamente a determinação dos aldeídos por HPLC ou GC (ARIAS-PÉREZ *et al.*, 2021; BAÑOS; SILVA, 2009; XU *et al.*, 2010, 2011). Especialmente para o caso de GC, técnicas HS-SPME são amplamente combinadas à análise das amostras (ARIAS-PÉREZ *et al.*, 2021; CHAICHI *et al.*, 2015; JUNG *et al.*, 2021; RAMÍREZ-GUÍZAR *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2009; SERRANO; GALLEGOS; SILVA, 2017a, 2017b).

HS-SPME e GC-MS foram usados para determinação de aldeídos em amostras de vegetais enlatados e sucos de fruta (SERRANO; GALLEGOS; SILVA, 2017b, 2017a), para determinação de aldeídos em bebidas alcoólicas (PAIANO *et al.*, 2014; RAMÍREZ-GUÍZAR *et al.*, 2020), em café (PETISCA *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2009, 2012; YANG *et al.*, 2016), legumes, vinho e queijos (JEONG *et al.*, 2015). SPME-GC-MS foi usada para determinação de aldeídos em amostras de carne, óleo e ovos (JUNG *et al.*, 2021)

Extração por SPME e HPLC-UV foram usadas para análise de aldeídos em água da chuva (BASHEER *et al.*, 2010), leite (REZENDE *et al.*, 2017), e soluções aquosas (BAÑOS; SILVA, 2009) e em plasma e urina (XU *et al.*, 2011).

Algumas outras técnicas de extração também reportadas para aldeídos foram HS-LPME-GC-MS para determinação de 2-FAL em café (CHAICHI; MOHAMMADI; HASHEMI, 2013), *single drop micro extraction* (SDME) para determinação de aldeídos em águas de rio e mar (LIU Q. *et al.*, 2010), *ultrassound assisted cloud point extraction* (UA-CPE) com determinação espectrométrica para determinação de FA em bebidas (TEMEL; GÜRKAN, 2017). Extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura e detecção por HPLC-UV foi usada para extrair FA de amostras de leite (REZENDE *et al.*, 2017). FA e AA foram extraídos de águas de rios e mares por micro extração de gota única com líquido iônico e análise por HPLC-UV (LIU Q. *et al.*, 2010).

A técnica de SALLE foi empregada para extrair aldeídos alifáticos de amostras de plasma humano com alta eficiência, exatidão e precisão, usando acetonitrila como solvente de extração e NaCl como sal indutor da separação de fase. Além disso, a técnica foi considerada a melhor entre as avaliadas para a

extração de benzaldeído dessas amostras, com recuperação na faixa de 94-98 % (KISHIKAWA; EL-MAGHRABEY; KURODA, 2019).

SALLE também foi combinada com DLLME para a extração de oxaldeídos de amostras de urina (PASTOR-BELDA *et al.*, 2017). Nessa análise foi usado o extrato de acetonitrila do SALLE como solvente de dispersão da DLLME e tetracloreto de carbono como solvente de extração. Essa combinação resultou em alto fator de enriquecimento do analito e ótimas taxas de recuperação (95-107 %).

SALLE também foi usada junto com micro extração líquido-líquido assistida por vórtex para potencializar a extração de furfurais em amostras de fruta. Taxas de recuperação de 80 % foram consideradas satisfatórias e alcançadas utilizando 1-hexanal como solvente de extração e NaCl para promover um efeito *salting-out* (ABU-BAKAR; MAKAHLEH; SAAD, 2014).

5.2.5.1 Microextração por difusão gasosa (GDME)

A microextração por difusão gasosa (GDME, do inglês *Gas Diffusion Microextraction*) é uma técnica de extração muito conveniente quando os analitos de interesse são compostos voláteis e semivoláteis. Nessa técnica, é utilizado um sistema de extração, representado na Figura 30, composto por um módulo de politetrafluoroetileno (PTFE) de dimensões reduzidas e uma membrana hidrofóbica microporosa e semipermeável. Conforme ilustrado, esse módulo é composto por uma peça superior (a), uma peça inferior (c) e uma membrana (b). O reagente de derivatização é dissolvido em um solvente de extração e ambos são inseridos no módulo de PTFE. Uma solução com a amostra (d) é inserida em um frasco (e) e este é fechado em torno do módulo. A amostra é mantida sob agitação constante (f) e aquecimento (g) para promover a volatilização dos analitos.

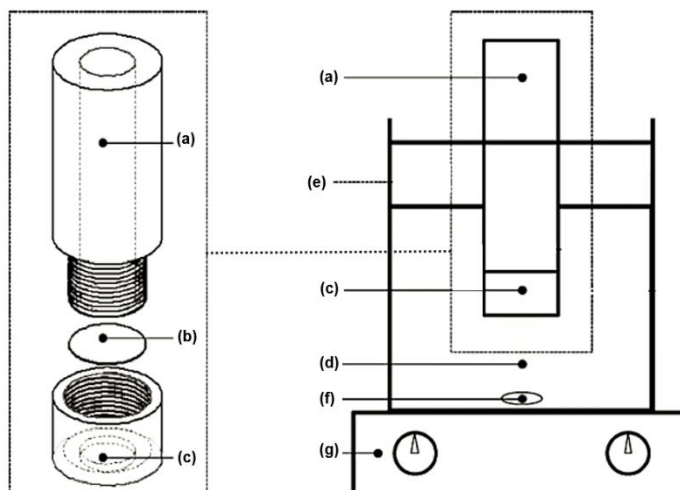


Figura 30 – Esquema do dispositivo de extração do GDME. (a) parte superior, (b) membrana, (c) parte inferior, (d) amostra, (e) frasco, (f) agitador magnético, (g) chapa de aquecimento

Fonte: Adaptado de Gonçalves *et al.* (2010).

A função da membrana utilizada no dispositivo de extração é permitir a transferência de massa dos analitos voláteis e semivoláteis, porém evitar a difusão dos solventes e demais componentes da matriz da amostra. Uma vez que os analitos volatilizados transpassam a membrana semipermeável, eles são recolhidos pelo solvente de extração. Como o solvente de extração contém o reagente de derivatização, a extração e a derivatização são realizadas simultaneamente. O processo de derivatização retira constantemente os analitos do solvente de extração, de forma que não ocorre uma saturação do solvente e um significativo enriquecimento e alta sensibilidade de extração são alcançados (GONÇALVES *et al.*, 2010; KISHIKAWA; EL-MAGHRABEY; KURODA, 2019; PACHECO *et al.*, 2010b).

Técnicas de extração que utilizam membranas já foram aplicadas em muitos processos industriais e sua aplicação analítica tem se difundido cada vez mais (PACHECO *et al.*, 2010b). A membrana separa a solução da amostra, chamada de solução doadora, de uma solução aceptora, e as moléculas do analito passam através da membrana da fase doadora para a aceptora. Se o sistema for deixado tempo suficiente sob as condições que permitem a extração, um equilíbrio entre as fases é alcançado (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2001). Em técnicas de separação clássicas que utilizam membranas, como filtração e diálise, as soluções dos dois lados da membrana estão em contato físico através dos poros da membrana, a diferença de tamanho dos poros é que promove a separação devido aos gradientes

de pressão e de concentração (MOSKVIN; NIKITINA, 2004). Outras formas de trabalhar com membranas em técnicas de separação consistem na sua impregnação com um solvente (CUKROWSKA *et al.*, 2004) ou na sua utilização como uma terceira fase no meio de um fluxo entre a fase doadora e a fase aceptora (GONÇALVES *et al.*, 2010; JÖNSSON; MATHIASSEN, 2001; MOSKVIN; NIKITINA, 2004; PACHECO *et al.*, 2010b).

Alguns fatores afetam a eficiência das extrações que utilizam membranas, entre eles a temperatura da extração, os solventes das soluções aceptoras e doadoras, adsorção dos analitos no material da membrana e porosidade da membrana. Um aumento na temperatura tende a causar um aumento na eficiência da extração, enquanto que a adsorção dos analitos ao material da membrana diminui a eficiência da extração e causa efeitos de memória (KUOSMANEN *et al.*, 2003).

O dispositivo usado na GDME foi apresentado por Gonçalves *et al.* (2010) de forma similar a um módulo de difusão de gás sem membrana descrito anteriormente (PACHECO *et al.*, 2010a). A coleta do analito via reação é enriquecida e acelerada pela presença de um agente de derivatização ($y_{acceptor}$). Considerando que na reação de derivatização, o analito (x) vai reagir com o $y_{acceptor}$ e produzir um produto estável (z), que há um fluxo estacionário entre a solução doadora e a aceptora e, considerando também, que o conteúdo de massa do analito no *headspace* não é significativo, o coeficiente de distribuição será dado de acordo com a equação 8.

$$D_{acceptor/doador} = \frac{[x_{acceptor}] + [z_{acceptor}]}{x_{doador}} \quad (8)$$

Assumindo que os coeficientes de atividade são iguais a 1, ou seja, assumindo que os valores de atividade são iguais às concentrações, a constante de equilíbrio da reação de derivatização ($K_{derivatização}$) é descrita de acordo com a equação 9.

$$K_{derivatização} = \frac{[z]}{[x] \cdot [y]} \quad (9)$$

As duas equações descritas a cima podem ser reagrupadas conforme descrito pela equação 10:

$$D_{acceptor/doador} = \frac{[x_{acceptor}] \cdot (1 + [y_{acceptor}] \cdot K_{derivatização})}{[x_{doador}]} \quad (10)$$

Onde, $[x_{acceptor}]/[x_{doador}]$ é o coeficiente de partição líquido-líquido, que nesse caso é igual à 1. Fornecendo a equação 11 descrita abaixo para o coeficiente de distribuição ($D_{acceptor/doador}$):

$$D_{acceptor/doador} = 1 + [y_{acceptor}] \cdot K_{derivatização} \quad (11)$$

A equação 11 indica que com um alto valor da constante de equilíbrio da reação de derivatização ($K_{derivatização}$), que é comum nesse tipo de reação, fatores de enriquecimento significativos podem ser atingidos. Portanto, limites de detecção baixos podem ser alcançados com o uso de GDME (GONÇALVES *et al.*, 2010).

As principais vantagens da técnica GDME para análise de aldeídos são a facilidade de montagem do dispositivo e de execução da análise, baixo custo quando comparada com a técnica mais frequentemente empregada para determinação de aldeídos, que é a SPME, e bons resultados de reprodutibilidade e seletividade para o procedimento de extração, especialmente se um reagente de derivatização estiver presente na solução aceptora.

GDME foi usada para a determinação de aldeídos em cerveja usando DNPH como reagente de derivatização. Os resultados mostraram um LD de 12 µg L⁻¹ para AA e de 1,5 µg L⁻¹ para FA (GONÇALVES *et al.*, 2010). GDME também foi utilizada para extração de FA, AA, 2-FAL, acroleína e butanal em diferentes bebidas alcoólicas usando ácido 4-hidrazinobenzóico como reagente de derivatização e o LD foi maior que 0,15 mg L⁻¹ para todos os analitos analisados (LIMA *et al.*, 2018). Aldeídos em sementes de café foram analisados por GDME e HPLC-DAD-MS/MS para estudar o perfil dos compostos carbonílicos de diferentes variedades de café (CORDEIRO *et al.*, 2018). GDME com derivatização simultânea com acetilacetona e determinação espectrofotométrica foi usada para determinação de FA em cortiça e apresentou LD de 0,14 mg kg⁻¹ (BRANDÃO *et al.*, 2017). AA, FA, acroleína,

propanodial, propanal e pentanal foram extraídos de óleos de cozinha por GDME combinada com DLLME e analisados por GC-MS, alcançando LD entre 0,05 e 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ e recuperações entre 95 e 110 %. FA também foi analisado em cosméticos com extração por GDME e detecção por imagens digitais usando um *smartphone*, com um LD de 0,2 mg kg^{-1} (LAMARCA *et al.*, 2019).

Outras aplicações utilizando GDME que já foram reportadas incluem, extração de sulfito em vinho (RAMOS *et al.*, 2016), extração de pesticidas organoclorados de leite (LOBATO *et al.*, 2021), extração de amônia de urina, silagem, grão e chorume (VALENTE *et al.*, 2017b), extração de α -diacetonas de pães (FERREIRA R. *et al.*, 2015) e para verificar a eficiência da proteção do aço por inibidores de corrosão voláteis (VALENTE *et al.*, 2020).

5.3 Objetivos

- Desenvolver um método para determinação de aldeídos voláteis em amostras de café utilizando GDME e SALLE como técnicas de extração e HPLC-UV para detecção de formaldeído, acetaldeído e 2-furfural.
- Otimizar a técnica GDME para extração de aldeídos voláteis em amostras de café
- Otimizar a técnica SALLE para obter a melhor recuperação dos aldeídos de amostras de café após extração por GDME
- Realizar a validação do método analítico proposto para determinação de formaldeído, acetaldeído e 2-furfural
- Aplicar o procedimento de extração por GDME e SALLE para análise de aldeídos em amostras variadas de café em pó e instantâneo

5.4 Parte Experimental

Nesta seção são descritos os reagentes e procedimentos utilizados para o desenvolvimento e otimização do método proposto de SALLE e GDME.

5.4.1 Reagentes e amostras

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau analítico e nenhuma purificação foi aplicada previamente à sua utilização. As soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura de resistividade maior que 18,2 MΩ cm e temperatura de 25 °C. Acetaldeído (AA), formaldeído (37 %) (FA), 2-furfural (2-FAL), acetonitrila (ACN), fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monobásico e 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Ácido clorídrico, cloreto de sódio, sulfato de magnésio, acetato de amônio, cloreto de potássio e carbonato de sódio foram adquiridos pela Nuclear. Sulfato de amônio foi adquirido pela Reagen e ácido fórmico pela Merck. As amostras de café em pó e instantâneo foram adquiridas em supermercados locais.

A solução tampão de fosfato de sódio (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Solution*) é preparada com concentração de 10 mmol L⁻¹ com fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monobásico. O pH da solução tampão é ajustado para 7,4 com HCl e NaOH.

Soluções estoque de AA e FA são preparadas em concentração de 2000 mg L⁻¹ cada em PBS pH 7,4. Solução estoque de 2-FAL é preparado na concentração de 1000 mg L⁻¹ em PBS pH 7,4.

5.4.2 Preparação do reagente de derivatização

O reagente de derivatização é preparado em concentração de 2,5 mmol L⁻¹ (0,5 g L⁻¹). Para o preparo do reagente de derivatização, 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) é dissolvida em solução com 20 % (v/v) de HCl 1,0 mol L⁻¹ e volume completado com uma mistura de água e acetonitrila na proporção de 1:1 (v/v). A solução deve ser deixada sob agitação até completa homogeneização. O reagente deve ser preparado diariamente.

5.4.3 Microextração por gás difusão (GDME)

O sistema de microextração por difusão gasosa (GDME) está ilustrado na Figura 31. Para a execução do procedimento, 10,0 mL de solução padrão ou amostra são inseridos em um frasco e este é fechado com o módulo de extração.

Para os procedimentos de extração em amostras, 0,5 g de café em pó e instantâneo foram pesados diretamente no frasco do GDME e solubilizados com 10,0 mL de água. O módulo de extração é composto por uma membrana hidrofóbica que é permeável a passagem de componentes gasosos. Nesse trabalho, foi utilizada uma membrana hidrofóbica microporosa Mitex™ de 5,0 µm (Merck Millipore). No módulo de extração é adicionado 1,0 mL do reagente de derivatização, DNPH 2,5 mmol L⁻¹. O sistema é então mantido sob agitação de 400 rpm em agitador magnético MR Hei-Tec (Heidolph Instruments), com aquecimento em banho maria à 60 °C por 15 minutos.

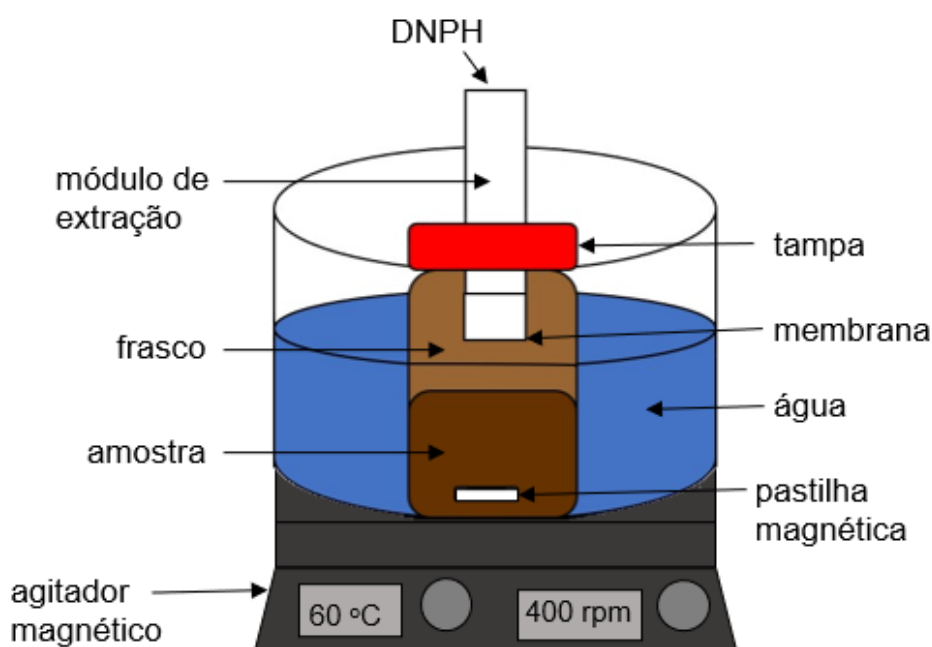


Figura 31 – Representação esquemática do sistema de microextração por difusão gasosa

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

5.4.4 Extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE)

O procedimento de extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE) é executado após extração das espécies voláteis, que incluem os aldeídos das amostras e soluções padrão, por GDME. Da solução aceptora, contendo o derivatizante e os analitos extraídos, uma alíquota de 400 µL é retirada e transferida para um tubo *Eppendorf*. À essa alíquota, são adicionados 600 µL de acetonitrila e 0,05 g de NaCl. A solução no tubo é agitada em vórtex por 1 minuto e centrifugada por 10 minutos à 2000 x g (6000 rpm) em uma mini centrífuga MLX-106 (Crystal

Industries). Após centrifugação, uma alíquota da fase superior é transferida para um *vial* para ser injetada em sistema HPLC-UV para separação e determinação dos aldeídos derivatizados.

5.4.5 Condições Cromatográficas

A separação cromatográfica e determinação dos aldeídos derivatizados, após extração das amostras e soluções padrão por GDME e SALLE, é realizada utilizando um sistema HPLC da Shimadzu, com auto amostrador e detector ultravioleta (UV). Os compostos são determinados em comprimento de onda de 365 nm. Uma coluna cromatográfica Phenomenex C18, com 250 mm de comprimento, de 4,6 mm de diâmetro e partículas de 5 μm , e coluna guarda de 4,0 mm e 3,0 mm da Phenomenex são usadas em forno Shimadzu à temperatura de 30 °C para as separações cromatográficas. Para o programa de eluição é utilizado o modo gradiente, com fase móvel composta por 0,1 % de ácido fórmico em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B). O fluxo da fase móvel é fixado em 1,0 mL min⁻¹ e o volume de injeção das amostras em 20 μL . O programa de eluição é baseado em método previamente reportado na literatura (GONÇALVES *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2009) com modificações e está descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Programa de eluição utilizado para as separações cromatográficas dos aldeídos em HPLC-UV

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	65	45
1	65	45
5	45	65
9	0	100
14	0	100
20	65	45
25	65	45

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

5.4.6 Verificação das melhores condições de extração

Para verificar o melhor solvente para compor a fase doadora do sistema GDME, soluções padrões de 50 mg L⁻¹ de cada aldeído foram preparadas com 10,0 mL de água, PBS pH 7,4 e etanol 12 % (v/v). Essas soluções foram adicionadas ao

frasco do sistema de extração e mantidas sob agitação e aquecimento à 60 °C por 15 minutos.

Também foi verificada a vantagem de empregar a técnica SALLE posteriormente à extração por GDME. Para isso, foram realizados 3 procedimentos (A, B e C), preparados conforme descrito:

Procedimento A: uma solução de 10,0 mL contendo 50,0 mg L⁻¹ de cada analito em água foi adicionada no frasco e 1,0 mL de solução de DNPH foi adicionado no módulo de extração. A amostra foi submetida ao procedimento de extração por GDME à 60 °C por 15 min e, após transcorrido esse tempo, uma alíquota da solução extratora foi transferida para *vial* e analisada por HPLC-UV.

Procedimento B: uma solução de 10,0 mL contendo 50,0 mg L⁻¹ de cada analito em água foi adicionada no frasco e 1,0 mL de solução de DNPH foi adicionado no módulo de extração. A amostra foi submetida ao procedimento de extração por GDME à 60 °C por 15 min e, após transcorrido esse tempo, uma alíquota de 0,4 mL da solução extratora foi transferida para um tubo *Eppendorf* contendo 5 mg de NaCl. Ao tubo foram adicionados mais 0,6 mL de ACN e a solução foi centrifugada por 10 minutos. Após transcorrido esse tempo, uma alíquota da fase superior formada foi transferida para *vial* e a amostra foi analisada por HPLC-UV.

Procedimento C: uma solução de 10,0 mL contendo 20,0 mg L⁻¹ de cada analito em água foi adicionada no frasco e 1,0 mL de solução de DNPH foi adicionado no módulo de extração. A amostra foi submetida ao procedimento de extração por GDME à 60 °C por 15 min e, após transcorrido esse tempo, uma alíquota da solução extratora foi transferida para *vial* e analisada por HPLC-UV.

5.4.7 Otimização das condições de GDME

Para avaliar a melhor temperatura e tempo de extração por GDME, foram utilizadas soluções padrão com 20 mg L⁻¹ de cada aldeído em procedimentos realizados conforme descrito nas seções anteriores. Para verificar a melhor temperatura, extrações foram realizadas em 15 minutos com temperatura nos valores de 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C. Para verificar o melhor tempo de extração, foram realizados procedimentos com 5, 10, 15, 20 e 30 minutos com a temperatura mantida em 60 °C.

5.4.8 Otimização das condições de SALLE

Para avaliar a composição do sal que mais favoreceria a extração dos aldeídos, 0,05 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$, MgSO_4 , KCl , Na_2CO_3 e NaCl foram utilizados como possíveis eletrólitos para promover o efeito *salting-out*. Com o objetivo de determinar a quantidade de NaCl que promove a melhor extração dos aldeídos das amostras, NaCl foi adicionado nas quantidades de 5; 10; 20; 30; 40; 50 e 70 mg. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5.4.9 Avaliação dos parâmetros analíticos

Para a construção da curva de calibração, soluções padrão de concentrações de 0,005; 0,25; 0,5; 1; 2,5 e 5,0 mg L^{-1} de cada aldeído foram preparadas e 10,0 mL foram adicionados no frasco do sistema GDME. O sistema foi fechado com o módulo de extração e o procedimento de extração e análise sucedeu conforme descrito nas seções anteriores. Com a área do pico do sinal de absorbância fornecido pelo detector UV (em unidade mAU) foi construída uma curva de calibração para verificar a linearidade entre a resposta do detector com as concentrações dos aldeídos.

Uma curva com adição de padrão foi construída para verificar a interferência da matriz no sinal obtido pelas análises. Para os experimentos com adição de padrão, 500 mg de amostra de café instantâneo foram pesados no frasco do sistema de extração e 10,0 mL de solução padrão dos aldeídos, preparadas nas mesmas concentrações das soluções da curva de calibração, foram adicionadas à amostra.

A repetibilidade do método foi avaliada pela análise de 6 réplicas preparadas no mesmo dia com solução padrão de cada aldeído nas concentrações de 0,1; 1 e 10 mg L^{-1} e submetidas ao procedimento de extração e análise propostos. A reprodutibilidade do método foi avaliada pela análise em dias diferentes de 6 amostras de soluções padrão com concentrações de 0,1; 1 e 10 mg L^{-1} de cada aldeído submetidas ao procedimento de extração e análise propostos. A recuperação do método proposto foi avaliada para os mesmos níveis de concentração dos aldeídos utilizadas para repetibilidade e reprodutibilidade (0,1; 1 e 10 mg L^{-1}).

5.5 Resultados e discussão

A reação de FA, AA e 2-FAL com DNPH sob condições ácidas produz os produtos derivatizados ilustrados na Figura 32. O programa de eluição cromatográfico utilizado para análise por HPLC-UV permitiu a separação dos aldeídos e determinação de seus respectivos compostos derivatizados. A Figura 33 demonstra o cromatograma obtido após a extração e análise de uma solução padrão de 20 mg L⁻¹ de cada um dos aldeídos.

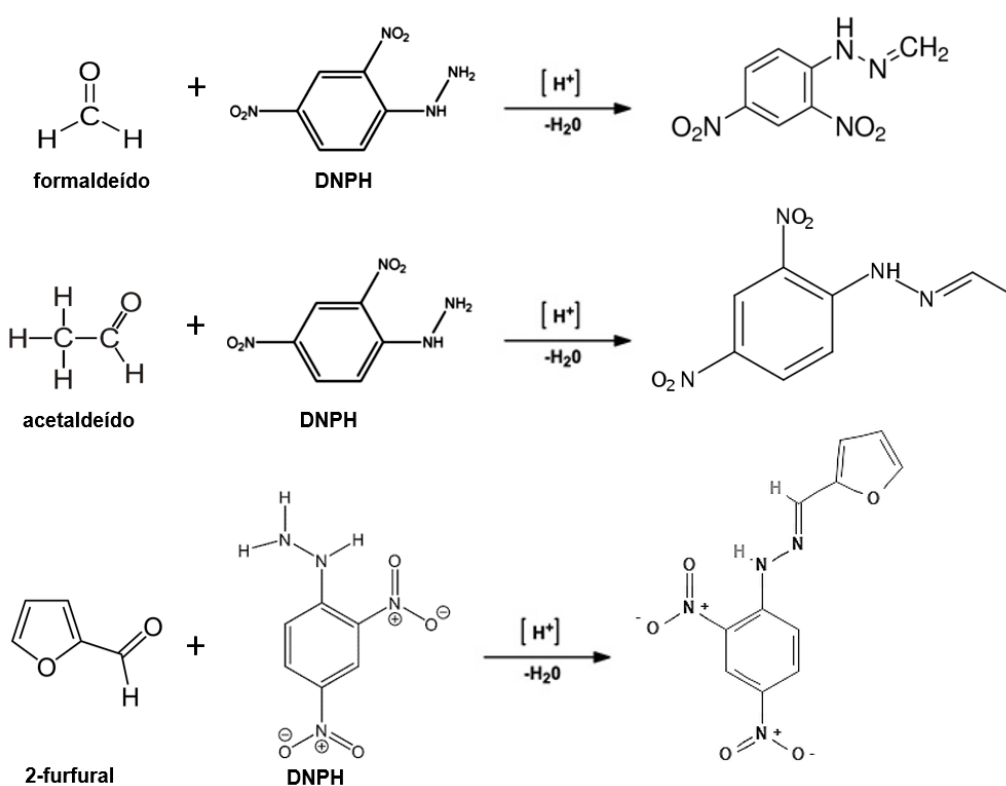


Figura 32 – Produtos formados pela reação de FA, AA e 2-FAL com o reagente de derivatização DNPH

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

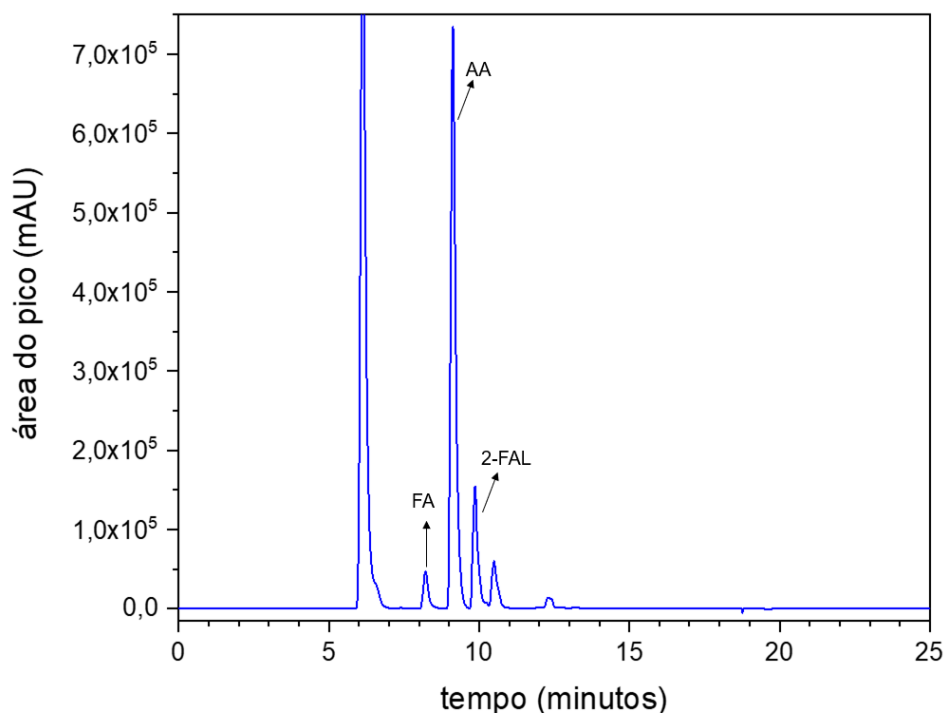


Figura 33 – Cromatograma da análise por HPLC-UV de solução padrão de 20 mg L^{-1} de FA, AA e 2-FAL extraídos por GDME e SALLE

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

5.5.1 Verificação das melhores condições de extração

Foi verificado o melhor solvente para ser utilizado na fase doadora e que poderia proporcionar a melhor volatilização dos aldeídos dos padrões e amostras na extração por GDME. Para isso, foi avaliada a área do pico cromatográfico obtido para os aldeídos após extrações realizadas sob as mesmas condições e com as mesmas concentrações de FA, AA e 2-FAL, alterando o solvente que foi usado para diluir os padrões. A Figura 34 mostra os resultados da área do pico obtida para extrações realizadas utilizando como solvente água deionizada (A), tampão de fosfato de sódio (PBS) em pH 7,4 (B) e etanol 12 % (v/v) (C). As extrações realizadas utilizando água como solvente apresentaram os melhores resultados para os 3 analitos avaliados. Quando comparada com a extração onde tampão PBS foi utilizado como solvente, a extração em água apresentou um incremento da área do pico de 157, 361 e 742 % de FA, AA e 2-FAL, respectivamente. Quando comparada com a extração utilizando mistura de etanol e água como solvente, a extração com água teve um incremento de 153, 169 e 1068 % no sinal da área do pico para FA, AA e 2-FAL, respectivamente. Com isso, água foi escolhida como o solvente da fase

doadora e foi utilizada para diluição dos padrões e amostras nos experimentos posteriores.

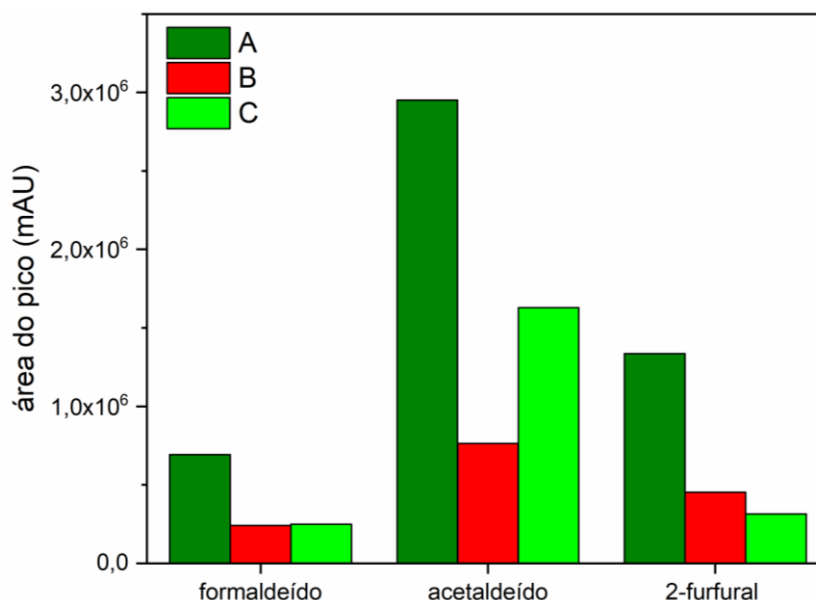


Figura 34 – Escolha do solvente da fase doadora para a extração por GDME: (A) - água deionizada; (B) - PBS pH 7,4; (C) - etanol 12 % (v/v)

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Para avaliar o efeito de adicionar uma etapa de SALLE ao procedimento de extração, foram comparadas as áreas do pico obtidas para 3 procedimentos, preparados conforme descrito na seção 5.4.6. Os resultados obtidos estão representados na Figura 35. O procedimento (A) corresponde a análise de uma amostra de 50 mg L⁻¹ de FA, AA e 2-FAL, cuja extração foi realizada sem adição de uma etapa de SALLE. O procedimento (B) corresponde a análise de uma amostra de aldeídos com concentração de 20 mg L⁻¹, em que a etapa de SALLE foi adicionada após a extração por GDME. O procedimento (C) corresponde a análise de uma amostra de aldeídos com concentração de 20 mg L⁻¹, em que a extração foi realizada sem a etapa de SALLE.

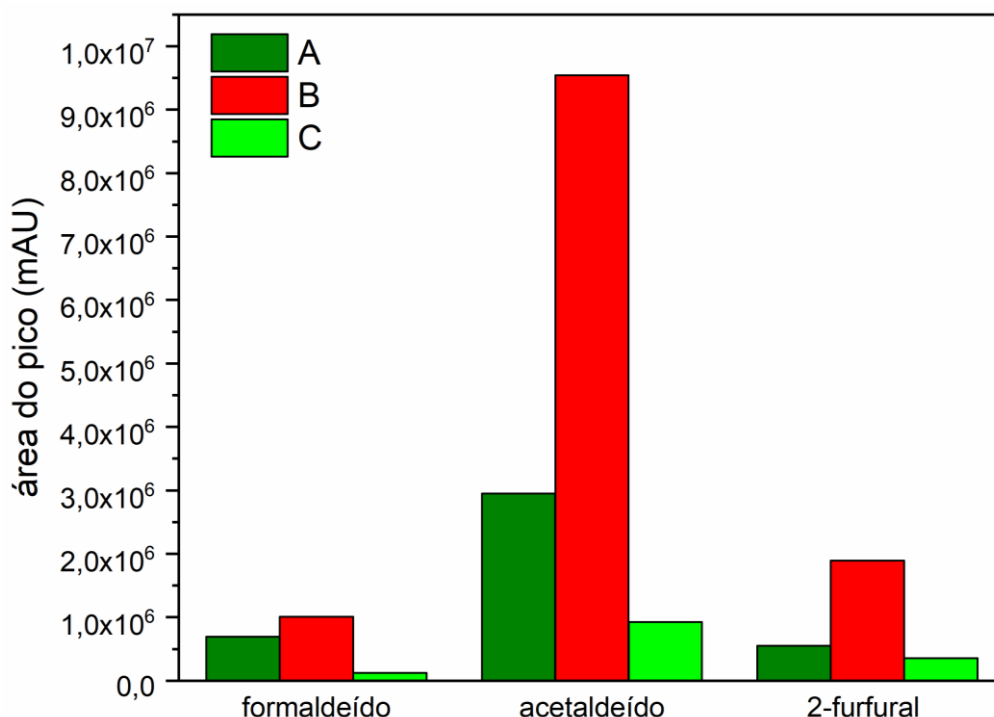


Figura 35 – Avaliação da etapa SALLE para tratamento da amostra após extração de FA, AA e 2-FAL por GDME: (A) - 50 mg L⁻¹ dos aldeídos, sem SALLE; (B) - 20 mg L⁻¹ dos aldeídos, com SALLE após a extração por GDME; (C) - 20 mg L⁻¹ dos aldeídos, sem SALLE

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Quando a técnica SALLE foi adicionada ao procedimento de extração, a área do pico observada teve um incremento de 812, 1033 e 531 % de FA, AA e 2-FAL, respectivamente, em relação ao procedimento em que as mesmas concentrações de aldeídos foram extraídas sem que a etapa de SALLE fosse adicionada. Quando concentrações maiores de aldeídos foram analisadas sem a inserção de SALLE no procedimento de extração, as áreas dos picos resultantes foram menores do que aquelas obtidas quando SALLE foi usada para extrair concentrações menores de aldeídos. Portanto, a adição de acetonitrila e de NaCl à solução aceptora permitiu isolar os analitos e aumentar a extração deles para a fase orgânica, tornando-os mais disponíveis para o reagente de derivatização. Dessa forma foi possível alcançar maiores concentrações do analito no solvente de extração e aumentar a sensibilidade de detecção do método.

5.5.2 Otimização das condições de SALLE

A adição de um sal à solução aquosa tem o efeito de enfraquecer a ligação de hidrogênio entre os analitos hidrofílicos e as moléculas de água, o que reduz a solubilidade do analito em água e aumenta sua transferência de massa para a fase orgânica. Para a escolha do sal e da quantidade que proporcionam a melhor transferência dos analitos para a fase orgânica, foram realizados procedimentos de extração conforme descrito para os métodos GDME e SALLE, porém na SALLE foram alterados os tipos de sais e as massas de sais utilizados para promover o efeito *salting-out*, e foi analisado a maior área de pico obtida para os aldeídos analisados.

Após a adição do sal à solução, foi possível observar visualmente variações entre a solubilidade de alguns deles no meio. As massas de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ adicionadas dissolveram totalmente. KCl e NaCl tiveram uma boa dissolução, mas um pouco da massa adicionada permaneceu no tubo de reação. MgSO_4 , Na_2CO_3 , Na_2SO_4 deixaram bastante resíduo no tubo da solução. Entre os sais analisados como possíveis eletrólitos (Figura 36), NaCl apresentou as maiores áreas de pico cromatográfico e foi escolhido para promover o efeito *salting-out* e potencializar a extração dos analitos nos procedimentos de SALLE.

Para a escolha da quantidade de sal que poderia promover melhores recuperações dos aldeídos pelo efeito *salting-out*, a SALLE foi realizada utilizando diferentes quantidades de NaCl (Figura 37). Para o AA, as adições crescentes de sal corresponderam mais notadamente a maiores valores na área dos picos cromatográficos observados pela análise por HPLC-UV, indicando uma grande sensibilidade na recuperação desse aldeído com o aumento na quantidade de NaCl adicionado. Porém, para o maior valor analisado (0,07 g de NaCl) a recuperação do AA apresentou um decaimento e uma maior variação na área do pico, indicando ser a quantidade de 0,05 g de NaCl a mais adequada para a recuperação do AA pela SALLE.

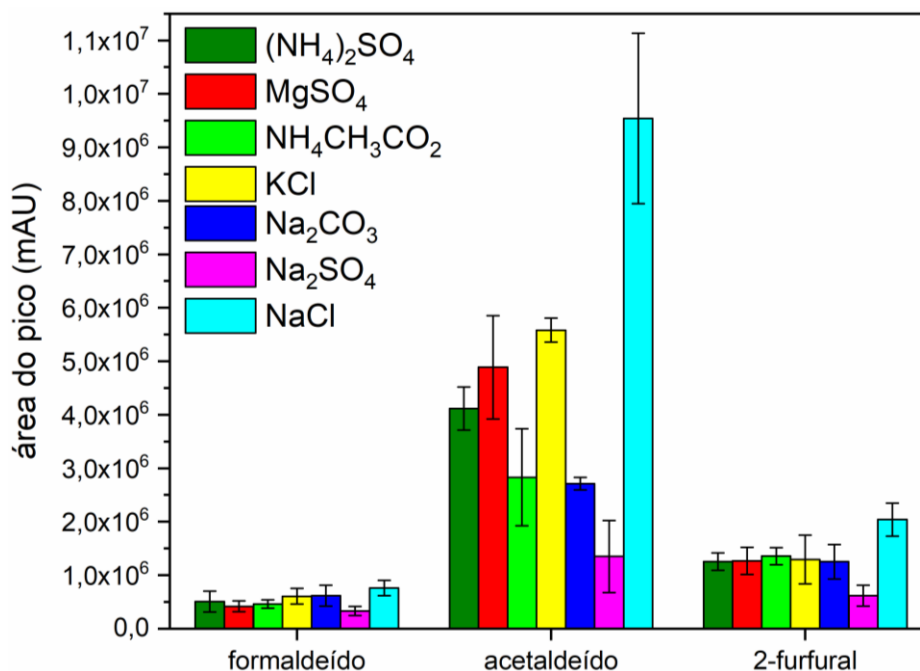


Figura 36 – Área dos picos cromatográficos obtido para os eletrólitos utilizados na SALLE para extração de FA, AA, e 2-FAL
Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

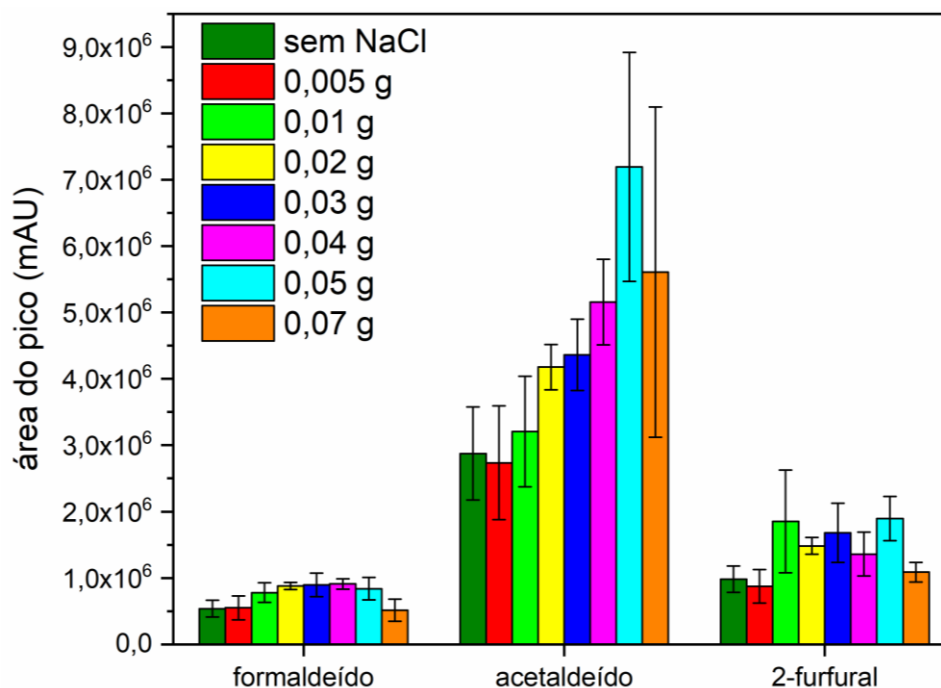


Figura 37 – Área dos picos cromatográficos obtido para diferentes quantidades de NaCl utilizadas na SALLE para extração de FA, AA e 2-FAL
Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Para a recuperação do FA, também representado na Figura 37, a quantidade de NaCl teve uma influência menor, porém, ainda assim, observa-se que maiores sinais de recuperação são observados quando sal é adicionado para promover a

reação. Uma adição de 0,01 g de NaCl à mistura de solução aceptora do GDME e acetonitrila já promove incrementos nos sinais de recuperação do FA. Porém, com 0,07 g a média de sinal observado apresenta um caimento, mesmo comportamento que foi observado para a recuperação do AA com essa quantidade de sal. Comportamento semelhante de aumento da eficiência da extração com o aumento da quantidade de sal adicionado, seguido por um decréscimo para concentrações mais elevadas do sal, também foi observado para extração de aldeídos por SALLE acoplada a extração por vórtex em amostras de suco de fruta (ABU-BAKAR; MAKAHLEH; SAAD, 2014).

Na recuperação do 2-FAL para diferentes quantidades de NaCl, ocorreram algumas variações entre os sinais observados que tornaram as recuperações similares, entretanto a adição de eletrólito mostrou ter efeito importante para resultados mais satisfatórios de recuperação desse aldeído. Junto com os resultados observados na recuperação de FA e AA com diferentes quantidades de NaCl, 0,05 g deste sal mostrou ser a escolha mais conveniente para a realização das extrações de 2-FAL e dos demais aldeídos.

5.5.3 Otimização da técnica GDME

Uma vez que a extração dos analitos por GDME é baseada na sua passagem para fase de vapor, a temperatura é um importante fator que precisa ser controlado e otimizado. O sinal obtido para as extrações realizadas com diferentes temperaturas está ilustrado na Figura 38, e demonstrou que a temperatura de 60 °C é a melhor entre as testadas para a volatilização e coleta dos aldeídos. O coeficiente de difusão dos vapores aumentam com a temperatura e a constante de Henry diminui com o aumento da temperatura, por isso usualmente, maiores taxas de extração são alcançadas em temperaturas mais elevadas (PACHECO *et al.*, 2010b). Todos os aldeídos analisados apresentaram um aumento na área do pico cromatográfico com a mudança de temperatura de 50 para 60 °C, mas o AA teve a recuperação mais favorecida com esse aumento. À 70 °C a recuperação média da área do pico do FA continuou a aumentar, entretanto a do AA e do 2-FAL diminuíram e as variações no resultado aumentaram para os três analitos. Em temperaturas mais elevadas, pode ocorrer um favorecimento das reações de absorção dos analitos no solvente de extração, entretanto, também ocorre diminuição da

solubilidade dos analitos no solvente, pois podem se desprender da solução mais facilmente em altas temperaturas. Ambos os processos são interdependentes nesta fase de coleta do analito. Portanto, 60 °C foi a temperatura adotada para os procedimentos de extração.

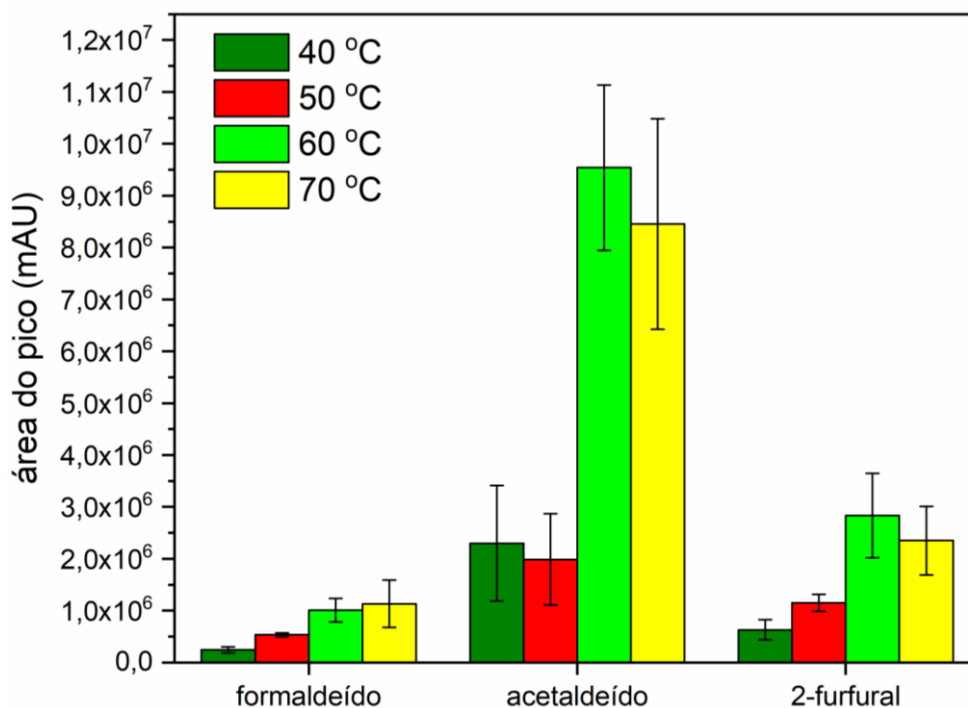


Figura 38 – Análise dos resultados da área do pico cromatográfico dos aldeídos para diferentes temperaturas de extração adotadas para o procedimento GDME
Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

O tempo de extração também é um fator que influencia diretamente na extração dos analitos. Tipicamente, após um longo período de tempo pode ocorrer uma saturação na solução de extração, entretanto, não é necessário trabalhar com o tempo de saturação de extração, apenas utilizar o mesmo tempo pré-estabelecido para a realização de todas as análises (PACHECO *et al.*, 2010b). Gonçalves *et al.* (2010) consideraram que 5 minutos de extração à 30 °C já eram suficientes para analisar aldeídos em cerveja por extração por GDME, porém adotaram o tempo de 15 minutos e a temperatura de 60 °C para garantir melhores resultados. Custodio-Mendonza *et al.* (2020) realizaram extração de aldeídos de amostras de óleos de cozinha usando GDME, com 30 minutos de extração e temperatura de 65 °C. Brandão *et al.* (2017) utilizaram 30 minutos de extração e 60 °C para extração de FA de amostras de cortiça e análise espectrofotométrica. Lima *et al.* (2018) determinaram FA, AA, 2-FAL, acroleína, butanal, propanal e benzaldeído em

diferentes bebidas alcoólicas por GDME com 20 minutos de extração à 60 °C. Cordeiro *et al.* (2018) analisaram aldeídos em sementes de café por GDME com 16 minutos de extração à 40 °C.

Os experimentos executados variando-se o tempo de extração das amostras pelo GDME são mostrados na Figura 39. Pode ser observado que os aldeídos tiveram um aumento na área do pico cromatográfico com o aumento de 10 para 15 minutos de extração. AA foi o analito que teve um aumento mais significativo no sinal da resposta com esse tempo. Com 20 minutos de extração, FA teve uma diferença pouco significativa no aumento da área do pico, enquanto AA e 2-FAL tiveram uma resposta menor. Ainda que as áreas dos picos de AA e 2-FAL tenham voltado a aumentar com 30 minutos de extração, não alcançaram resultados melhores do que aqueles observados para extrações realizadas em 15 minutos que justificassem a adoção de tempos de extração mais longos. Dessa forma, 15 minutos pareceu ser o tempo mais adequado para a realização do procedimento e foi o período estabelecido para as análises posteriores.

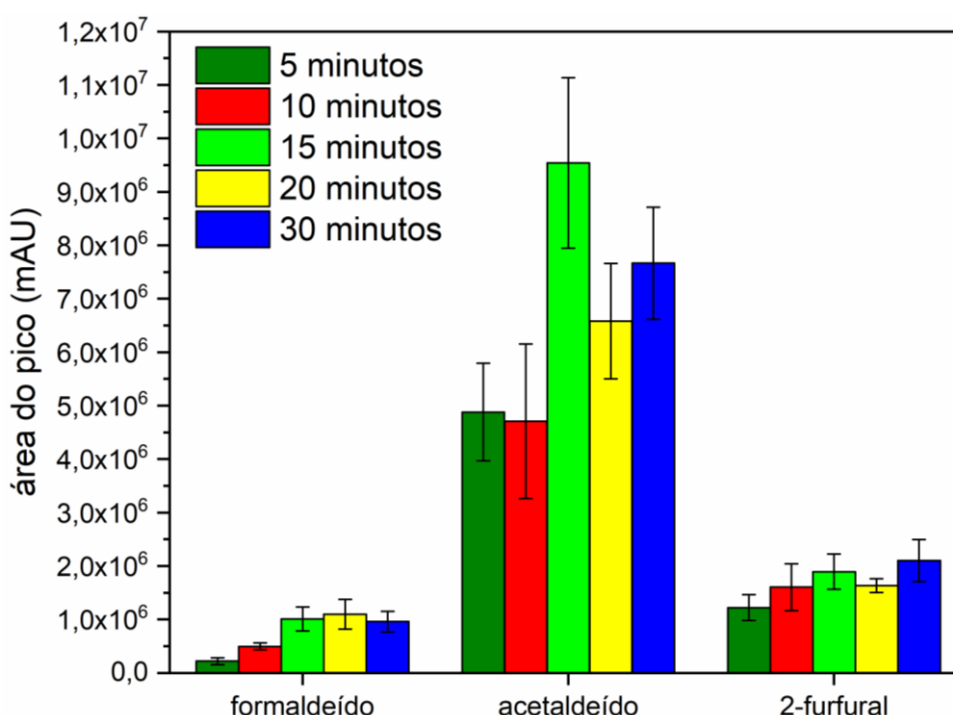


Figura 39 – Áreas dos picos cromatográficos observadas para os diferentes tempos de extração adotados para o GDME

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Outro fator importante a considerar na GDME é a agitação da amostra, pois ela favorece um aumento na volatilização das espécies para a fase de vapor e,

portanto, disponibilização das espécies voláteis para a solução aceptora. Trabalhos publicados anteriormente demonstraram que a agitação tem influência até um certo ponto da extração, a partir do qual permanece constante (PACHECO *et al.*, 2010b). Possivelmente, seu papel é apenas homogeneizar a amostra e levar o analito para interface líquido-gás. Por isso, a agitação não foi avaliada como fator a ser otimizado para a extração dos aldeídos neste trabalho, porém foi adotada na mesma velocidade em todos os procedimentos realizados.

5.5.4 Performance analítica do método proposto

A linearidade do método é avaliada pela análise da regressão linear. Para verificar a linearidade, uma curva de calibração foi construída com o sinal da área dos picos fornecida pela análise por HPLC-UV com o aumento nas concentrações de padrão de aldeídos, de 0,005 à 5 mg L⁻¹, adicionadas no frasco de GDME e submetidas ao procedimento de extração. Boas linearidades foram obtidas para as faixas de concentração analisadas, com os coeficientes de determinação (r^2) maiores de 0,99 para a curva de calibração de todos os aldeídos.

Para verificar a influência da matriz na análise da amostra, uma curva com adição de padrão foi construída com incrementos dos aldeídos na amostra nas mesmas concentrações utilizadas na curva da calibração. As curvas com adição de padrão também apresentaram boa linearidade na faixa de concentração avaliada, com r^2 maiores do que 0,99. A equação da reta de regressão linear e o coeficiente de determinação das curvas de calibração e curvas com adição de padrão de todos os aldeídos analisados estão descritos na Tabela 5.

Para todos os aldeídos, a análise do teste t de *Student* com 95 % de confiança indicou que os declives da curva de calibração e da curva com adição de padrão são estatisticamente diferentes ($t < 0,05$), portanto, ficou demonstrado que a matriz exerce um efeito na análise dos aldeídos e a curva com adição de padrão deve ser o método adotado para a quantificação das amostras.

Tabela 5 – Equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) obtidos pela curva de calibração e pela curva com adição de padrão

	Aldeído	Equação da reta	r^2
CC	FA	$y = (28600,97 \pm 596,73) \times [\text{FA}] + (30147,16 \pm 542,04)$	0,999
	AA	$y = (85133,04 \pm 253,29) \times [\text{AA}] + (281710,96 \pm 5452,65)$	0,999
	2-FAL	$y = (60636,59 \pm 1845,52) \times [\text{2-FAL}] + (137600,19 \pm 3944,06)$	0,999
CAP	FA	$y = (28740,02 \pm 16,07) \times [\text{FA}] + (28102,16 \pm 700,84)$	0,999
	AA	$y = (382319,77 \pm 13417,08) \times [\text{AA}] + (212098,41 \pm 8279,27)$	0,994
	2-FAL	$y = (114972,49 \pm 938,62) \times [\text{2-FAL}] + (65390,82 \pm 650,12)$	0,999

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Notas:

CC – curva de calibração

CAP – curva com adição de padrão

A curva de calibração e a curva com adição de padrão obtidas para FA estão representadas na Figura 40. Os limites de detecção e quantificação para esse aldeído foram, respectivamente, de 0,12 e 0,40 mg L⁻¹, que correspondem a 9,6 e 32 mg kg⁻¹.

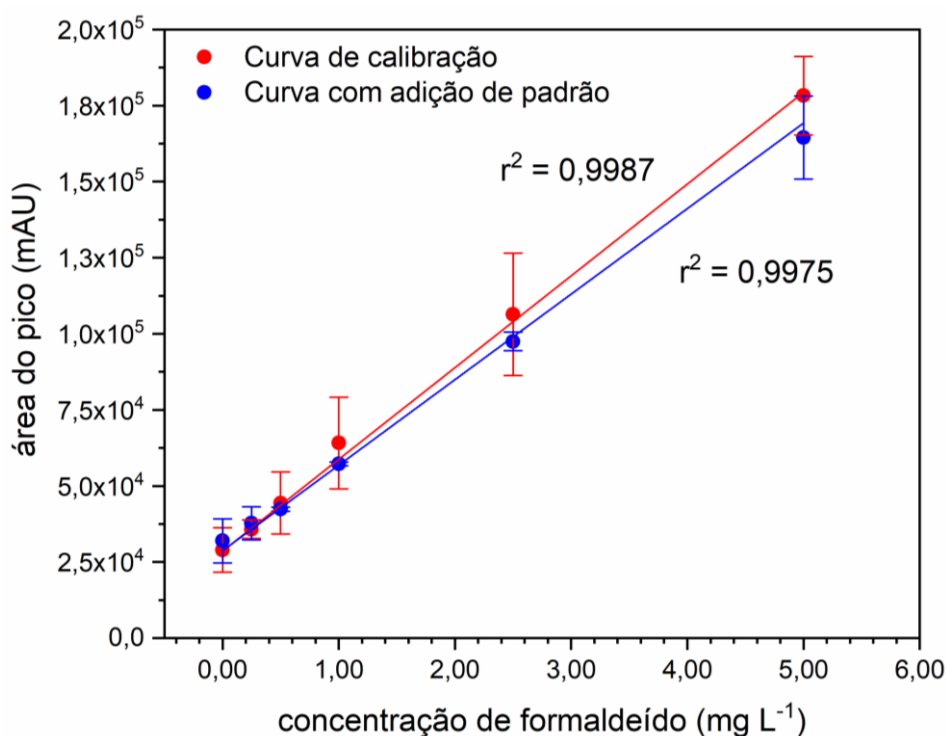


Figura 40 – Curva de calibração e curva com adição de padrão obtidas para a análise de formaldeído pelo método proposto

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

A curva de calibração e a curva com adição de padrão obtidas para AA estão representadas na Figura 41. Os limites de detecção e quantificação para esse

aldeído foram, respectivamente, de 0,08 e 0,27 mg L⁻¹, que correspondem a 6,4 e 21,6 mg kg⁻¹.

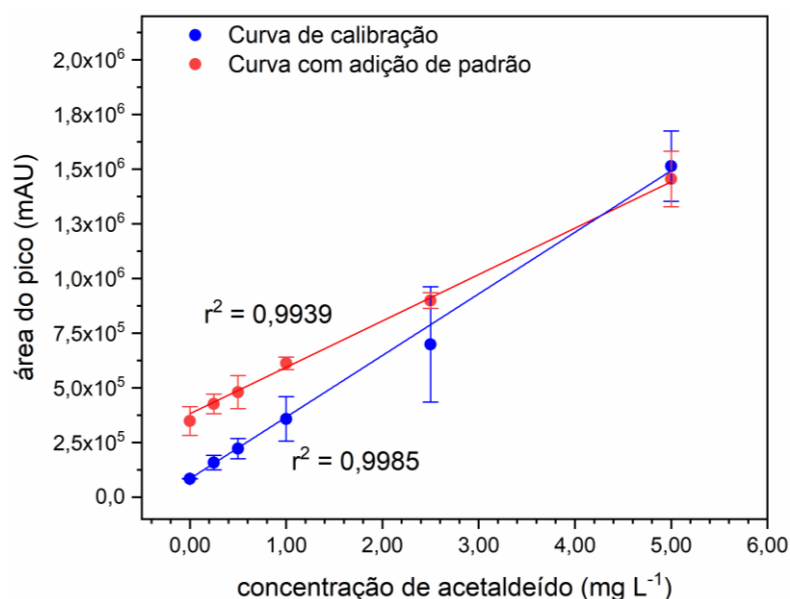


Figura 41 – Curva de calibração e curva com adição de padrão obtidas para a análise de acetaldeído pelo método proposto

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

A curva de calibração e curva com adição de padrão obtidas para 2-FAL estão representadas na Figura 42. Os limites de detecção e quantificação para esse aldeído foram, respectivamente, de 0,08 e 0,27 mg L⁻¹, que correspondem a 6,4 e 21,6 mg kg⁻¹.

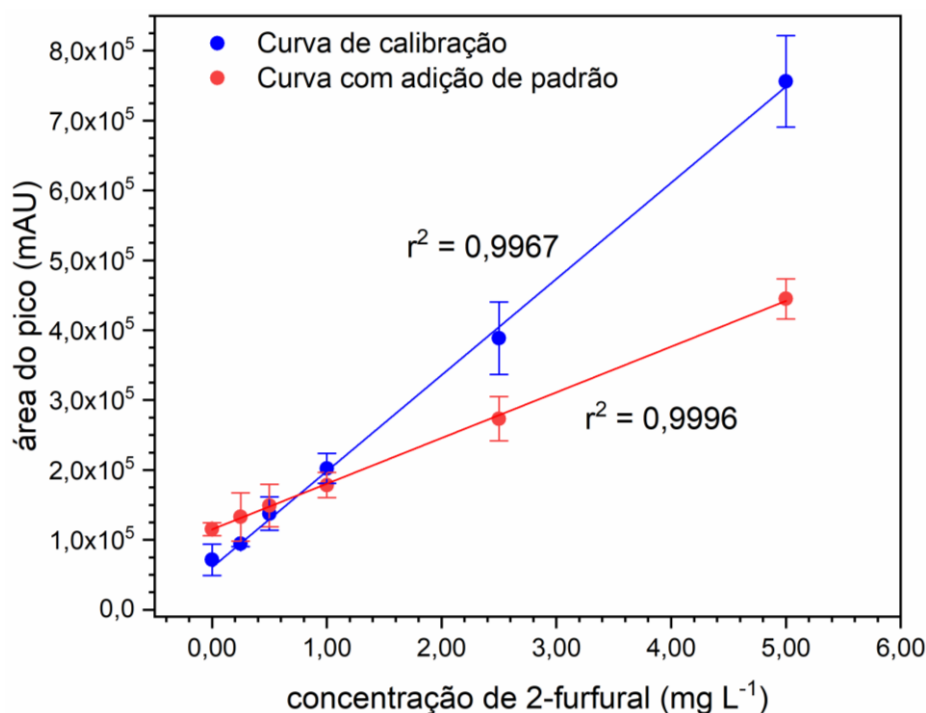


Figura 42 – Curva de calibração e curva com adição de padrão obtidas para a análise de 2-furfural pelo método proposto
Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

A repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação do método foram avaliadas pela análise de 6 réplicas de amostras com adição de solução padrão com concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ de cada um dos aldeídos. A repetibilidade e a reprodutibilidade analisam o desvio padrão das concentrações dos aldeídos em amostras analisadas no mesmo dia e em dias diferentes, respectivamente. A recuperação avalia a proximidades dos resultados de concentração obtidos com os resultados esperados. Os valores de repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação para as 3 concentrações avaliadas estão descritos na Tabela 6. As repetibilidades apresentaram valores entre 6 e 10 % e a reprodutibilidade teve valores entre 7 e 11 %. As recuperações ficaram entre 86 e 102 %. Esses valores são considerados satisfatórios para a validação da precisão e exatidão do método.

Tabela 6 – Resultados de repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação obtidos para os aldeídos analisados pelo método GDME-SALLE proposto

mg L ⁻¹	Repetibilidade (%)			Reprodutibilidade (%)			Recuperação (%)		
	0,1	1	10	0,1	1	10	0,1	1	10
acetaldeído	9	6	9	10	7	10	92	97	99
formaldeído	8	8	8	7	9	9	86	102	95
2-furfural	10	6	6	11	8	11	94	90	96

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Os parâmetros analíticos avaliados mostraram que o método proposto é adequado para a análise de FA, AA e 2-FAL em amostras de café. Com isso a extração por GDME e SALLE foi aplicada para a análise de aldeídos em amostras de diferentes marcas de café em pó e café instantâneo.

5.5.5 *Análise de amostras de café pelo método proposto*

17 amostras de café em pó e instantâneo de diferentes marcas e variedades foram utilizadas como amostras para extração de aldeídos pelo método de GDME e SALLE propostos e analisadas por HPLC-UV. Com as curvas analíticas obtidas foram calculadas as concentrações de FA, AA e 2-FAL e esses valores, expressos em mg kg^{-1} , estão descritos na Tabela 7.

Entre as amostras analisadas, as concentrações médias de FA variaram de $4,93 \text{ mg kg}^{-1}$ em uma amostra de café instantâneo forte a 119 mg kg^{-1} em um café instantâneo descafeinado, a menor concentração média detectada de AA foi de $3,62 \text{ mg kg}^{-1}$ em uma amostra de café em pó tradicional e a maior foi de 245 mg kg^{-1} em amostra de café instantâneo extraforte. Para o 2-FAL, $0,831 \text{ mg kg}^{-1}$ em uma amostra de café instantâneo *gourmet* foi a menor concentração encontrada e $57,5 \text{ mg kg}^{-1}$ em uma amostra de café instantâneo suave foi a maior.

2-FAL foi determinado em concentração de $5,6$ à 21 mg kg^{-1} em amostra de café arábica (CHEONG *et al.*, 2013), de 17 à $63 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ e de 1 à 20 mg kg^{-1} em amostras de café em pó e instantâneo, respectivamente (CHAICHI *et al.*, 2015; CHAICHI; MOHAMMADI; HASHEMI, 2013). Em amostras de café turco, 2-FAL foi encontrada nos níveis de 1590 à 1835 mg kg^{-1} (MORTAS *et al.*, 2017). Ludwig *et al.* (2014) encontraram 2-FAL na faixa de 10 à $24 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e AA entre 18 e $105 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ em amostras de café e Jeong *et al.* (2015) encontraram concentrações de $0,87$ à $3,37 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de AA e $0,44$ a $1,52 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de FA em café instantâneo e de $1,01$ a $20,1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,26$ a $0,42 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de AA e FA, respectivamente, em café em pó.

Tabela 7 – Concentrações de FA, AA e 2-FAL, em mg kg⁻¹, encontradas nas diferentes marcas e variedades de café extraídas por GDME e SALLE e analisadas por HPLC

Amostra	Modo de preparo	Característica	FA (mg kg ⁻¹)	AA (mg kg ⁻¹)	2-FAL (mg kg ⁻¹)
A	instantâneo	clássico	20,8 (7,2)	20,7 (11,8)	< LD
	instantâneo	tradicional	23,9 (8,1)	23,7 (4,2)	23,8 (12,2)
B	em pó	tradicional	27,2 (10,9)	< LD	1,36 (0,68)
C	em pó	tradicional	8,99 (1,71)	< LD	< LD
D	em pó	tradicional	40,3 (12,3)	61,7 (6,1)	54,3 (3,1)
	em pó	descafeinado	44,2 (14,6)	3,62 (1,31)	17,5 (5,8)
	instantâneo	tradicional	18,6 (0,1)	62,2 (11,9)	< LD
	instantâneo	extraforte	7,50 (6,0)	245,8 (13,2)	6,59 (6,63)
	instantâneo	liofilizado	17,2 (0,3)	167,3 (15,0)	53,6 (3,3)
	instantâneo	descafeinado	119,5 (50,5)	47,9 (10,2)	19,2 (6,2)
E	instantâneo	suave	10,8 (5,2)	70,2 (7,6)	57,5 (10,7)
	instantâneo	forte	4,9 (1,8)	62,4 (12,8)	51,9 (3,6)
	instantâneo	extraforte	25,4 (8,7)	25,2 (6,6)	18,1 (2,7)
	instantâneo	<i>gourmet</i>	22,6 (2,2)	5,2 (0,26)	0,83 (0,17)
F	instantâneo	tradicional	67,5 (4,4)	64,8 (2,6)	13,2 (2,7)
G	instantâneo	<i>gourmet</i>	7,2 (4,1)	62,4 (9,1)	7,28 (1,35)
H	instantâneo	tradicional	31,4 (7,0)	108,4 (14,7)	38,3 (3,8)

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

5.6 Conclusões

O método de extração utilizando GDME e SALLE com posterior detecção por HPLC-UV foi proposto para analisar aldeídos voláteis de amostras de café e mostrou ser uma alternativa adequada para a detecção e quantificação de FA, AA e 2-FAL nessas amostras. A SALLE pode ser realizada simultaneamente à derivatização, reduzindo as etapas de tratamento da amostra. Otimizações foram feitas para os procedimentos experimentais da GDME e da SALLE e os parâmetros analíticos do método foram validados.

Melhores recuperações para os analitos foram obtidas quando para a GDME foram mantidos temperatura de 60 °C e tempo de extração de 15 minutos. Entre os sais analisados para promover o efeito *salting-out*, NaCl foi o que mais favoreceu a extração e foi adicionado com massa de 0,05 g à solução extratora.

Os valores de repetibilidade e reprodutibilidade estiveram entre 6 e 11 % e recuperação entre 86 e 102 %. Todos os r^2 das curvas analíticas foram maiores do que 0,99. Os limites de detecção estiveram entre 6,4 e 9,6 mg kg⁻¹ e os limites de quantificação entre 21,6 e 32,0 mg kg⁻¹. Os resultados de validação confirmaram a capacidade do método para determinação de FA, AA e 2-FAL em amostras de café. As determinações nas amostras analisadas mostraram concentrações entre 4,93 mg kg⁻¹ e 119 mg kg⁻¹ para FA, de 3,62 mg kg⁻¹ a 245 mg kg⁻¹ para AA e de 0,831 mg kg⁻¹ a 57,5 mg kg⁻¹ para 2-FAL.

O método de extração proposto com GDME e SALLE apresenta vantagens como a simplicidade do procedimento experimental, sua fácil operação, boas seletividade e sensibilidade e reprodutibilidade. Além disso, é um método ambientalmente amigável, uma vez que utiliza poucas quantidades de solventes orgânicos, e mostrou que pode ser aplicado a análises de aldeídos em amostras de café e ser uma alternativa para metodologias analíticas previamente descritas na literatura.

6 CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ANALÍTICO POR POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO (MIP) ACOPLADO À SALLE PARA DETERMINAÇÃO DE 5-(HIDROXIMETIL)-2-FURFURAL EM AMOSTRAS DE CAFÉ

Neste Capítulo é apresentado o desenvolvimento de um sensor eletroquímico baseado em um polímero molecularmente impresso (MIP) para detecção de HMF em café. Uma etapa de SALLE foi adicionada ao procedimento para proporcionar melhores extrações do analito. O MIP foi formado por eletropolimerização e os parâmetros analíticos desse procedimento foram otimizados, assim como as condições adotadas para a SALLE.

Também são apresentados neste Capítulo uma introdução sobre HMF em alimentos e sobre sensores eletroquímicos.

6.1 Introdução

A maioria dos alimentos que fazem parte da dieta do dia-a-dia passa por algum tratamento térmico antes do consumo, mesmo que seja um tratamento doméstico, como ferver, assar, fritar ou cozinhar (MORTAS *et al.*, 2017). Os tratamentos térmicos promovem diversos benefícios ao alimento, como o seu amolecimento, desenvolvimento de cor, textura, aroma e sabor desejáveis, remoção de toxinas, inativação e destruição de microrganismos (CHOUDHARY *et al.*, 2020). Durante o tratamento térmico podem acontecer no alimento reações de Maillard ou de escurecimento não-enzimático. Reação de Maillard ocorre quando há desidratação térmica de carboidratos e aminoácidos durante o processamento ou armazenamento dos alimentos (ZHANG L. *et al.*, 2019).

O 5-(hidroximetil)-2-furfural (HMF) é um dos mais importantes produtos intermediários formados na reação de Maillard e também um dos principais produtos gerados pela degradação de açúcares hexoses, como glicose, frutose, sacarose, celulose e inulina, sob condições ácidas (CHOUDHARY *et al.*, 2020). HMF já foi detectado em uma grande variedade de alimentos, como sucos, frutas secas, cafés, mel, leite, cereais, vinagre, vinhos e cervejas (CHOUDHARY *et al.*, 2020; SHAPLA *et al.*, 2018). São muitos os fatores que influenciam na formação de HMF, como temperatura aplicada nas etapas de processamento, tipos e concentrações dos

açúcares presentes, atividade da água, adição de aditivos, tempo de armazenamento e material onde o alimento fica armazenado, por isso sua concentração é muito variada, mesmo entre alimentos do mesmo tipo (MASATCIOGLU; NG; KOKSEL, 2015; MORTAS *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2011; PÉREZ-BURILLO *et al.*, 2019)

A presença de HMF nos alimentos e bebidas é associada a fatores que contribuem de forma positiva para suas características organolépticas e, por isso, é considerado um componente de importância econômica primária para a indústria de alimentos. Devido à forte relação entre sua presença no alimento e o tratamento térmico aplicado à ele, a concentração de HMF é amplamente reconhecida como um importante parâmetro para avaliar a qualidade do mel (CHEN *et al.*, 2019b; GOMES *et al.*, 2010) e verificar as melhores condições de tratamento térmico no seu preparo (BILUCA *et al.*, 2014; FALLICO *et al.*, 2004). O HMF já foi utilizado para monitorar os processos de aquecimento em produtos à base de cereais, como pães (CHOUDHARY *et al.*, 2020) e verificar diferenças nos procedimentos de cozimento de batatas, cenouras, peixes, porco e frango (CHOUDHARY *et al.*, 2020). Também foi considerado um indicador químico adequado para controlar processamento e armazenamento de chás (PÉREZ-BURILLO *et al.*, 2019) e o grau de torrefação de cafés (MACHEINER *et al.*, 2021).

O café é a principal via de exposição humana ao HMF (ARRIBAS-LORENZO; MORALES, 2010; CHOUDHARY *et al.*, 2020; HUSØY *et al.*, 2008; RUFÍÁN-HENARES; DE LA CUEVA, 2008; SHAPLA *et al.*, 2018). O HMF não está presente de forma natural em sementes de café e sua concentração depende dos processos de produção ou variedades de café comercializadas, como mocha, expresso, café em pó para ser filtrado e café instantâneo, tipos de sementes, regiões de origem e dos tratamentos térmicos aplicados, principalmente durante a torrefação (CIARAMELLI; PALMIOLI; AIROLDI, 2019; HAMZALIOĞLU; GÖKMEN, 2020; MACHEINER *et al.*, 2021; MORTAS *et al.*, 2017; OKARU *et al.*, 2020).

Métodos analíticos para determinação de HMF atraem grande atenção científica. Sua presença pode ser utilizada para obter informações acerca da degradação do alimento, dos processamentos empregados e de possíveis adulterações e contaminações e são as razões para monitorá-lo em alimentos que são ricos nesse composto e altamente consumidos, como o café (OKARU *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2011; SHAPLA *et al.*, 2018).

O método tradicionalmente indicado para a determinação de HMF em alimentos é conhecido por apresentar desvantagens, como baixa sensibilidade e seletividade e uso de reagentes tóxicos. Métodos eletroquímicos tem sido amplamente empregados em diversos tipos de análise em diferentes amostras devido à sua alta sensibilidade, simplicidade, rapidez e baixo custo. Entretanto, ainda existe uma escassez na literatura de métodos eletroquímicos para a determinação de HMF em alimentos. Entre os métodos eletroquímicos, sensores formados por polímeros molecularmente impressos (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*) têm mostrado potencial como alternativa para análise de uma grande variedade de compostos orgânicos em diferentes matrizes. Em especial, analitos presentes em baixas concentrações em amostras complexas representam um desafio devido à grande interferência da matriz. Consequentemente, técnicas de preparo de amostra devem ser empregadas previamente a análise eletroquímica para promover a extração e pré-concentração dos analitos e diminuir a interferência da matriz da amostra (MOHAMMED *et al.*, 2016).

Esse trabalho buscou desenvolver um método analítico para determinação de HMF em amostras de café, usando a técnica de extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE) para extrair o HMF das amostras e um sensor eletroquímico baseado em polímero molecularmente impresso (MIP) para determinação seletiva de HMF por voltametria. As etapas de preparação do MIP e extração por SALLE foram otimizadas, os parâmetros analíticos do método foram verificados para sua validação e o método foi aplicado para determinação de HMF em amostras de café em pó e café instantâneo.

6.2 Revisão Bibliográfica

O HMF é um dos principais intermediários formados nas reações de Maillard e na degradação de açúcares, já foi detectado em uma grande variedade de alimentos e pode ser utilizado como um marcador da extensão dessas reações e como um indicador do tratamento térmico aplicado aos alimentos (CHOUDHARY *et al.*, 2020; SHAPLA *et al.*, 2018).

O HMF também atrai atenção científica pelos seus efeitos ao organismo humano, pois tanto efeitos adversos quanto efeitos benéficos à saúde já foram

relacionados ao HMF e seus potenciais toxicológicos e mutagênicos ainda estão sob avaliação (FARAG *et al.*, 2020).

O método mais amplamente empregado para determinação de HMF em alimentos é o HPLC (CHOUDHARY *et al.*, 2020). Entretanto, inconvenientes relacionados à reação tradicionalmente utilizada para esse método são bem reconhecidos. Métodos eletroquímicos podem ser uma alternativa à métodos analíticos convencionais por conta de seu baixo custo, simplicidade, rapidez e uso de pequenas quantidades de reagentes.

Eletrodos quimicamente modificados representam um campo de grande crescimento nas aplicações das técnicas eletroanalíticas devido ao interesse no seu uso clínico e industrial. Uma das abordagens comuns para incorporar um modificador na superfície do eletrodo tem sido a cobertura com um filme polimérico apropriado (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003).

Polímeros molecularmente impressos (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*) são receptores artificiais. Eles operam em um mecanismo de chave-fechadura para ligar moléculas por afinidade e especificidade de forma semelhante aos mecanismos de ligação entre anticorpos e receptores biológicos. Sensores baseados nesses receptores têm demonstrado vantajosa aplicabilidade para análise de amostras complexas devido à alta afinidade e seletividade com as moléculas de interesse (VASAPOLLO *et al.*, 2011).

6.2.1 HMF em alimentos

O 5-(hidroximetil)-2-furfural (HMF), também conhecido por 5-(hidroximetil)-2-furfuraldeído ou 5-hidroximetilfurfural é um composto heterocíclico de baixa massa molecular que possui aldeído e álcool como grupos funcionais e um anel furano (CHOUDHARY *et al.*, 2020).

Nos alimentos, o HMF é formado por diferentes reações, que seguem múltiplas rotas e envolvem diferentes precursores e intermediários e, por isso, ele está amplamente presente nos alimentos, principalmente em alimentos que passam por algum tipo de processamento (CHOUDHARY *et al.*, 2020; ZHANG L. *et al.*, 2019). Carboidratos, aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos poli-insaturados e carotenóides já foram relatados como compostos precursores de HMF em alimentos. Mel, café, pães, cereais, sucos de fruta, frutas secas, geleias, cerveja, vinho e

vinagre balsâmico são alguns dos alimentos em que HMF já foi detectado (CHOUDHARY *et al.*, 2020; SHAPLA *et al.*, 2018).

A reação de Maillard tem o HMF como um dos mais importantes produtos intermediários, e essa rota é o principal caminho de formação do HMF em alimentos. Reações de Maillard ocorrem quando carboidratos são submetidos a aquecimento na presença de aminoácidos ou proteínas (ZHANG L. *et al.*, 2019). O grupo carbonila de açúcares redutores, como glicose e frutose, e o grupo amino livre de aminoácidos atuam como os precursores das reações de Maillard que ocorrem durante a produção ou armazenamento dos alimentos que contêm proteínas e carboidratos (ZHANG L. *et al.*, 2019).

Uma outra rota importante para a formação de HMF em alimentos é a degradação de carboidratos sob tratamento térmico e condições ácidas. Após hidrólise, oligo e polissacarídeos produzem hexoses. Por essa rota, sacarose pode ser decomposta em glicose e frutose, que posteriormente sofrem enolização e desidratação do cátion frutofuranosil. Quando essa reação acontece sob condições pirolíticas secas e à uma temperatura acima de 250 °C, o cátion frutofuranosil pode ser convertido ao HMF, como representado na Figura 43. Rendimentos mais altos são obtidos quando HMF é formado a partir da frutose, em comparação à sua formação pela glicose, pois a reatividade da glicose é menor e sua taxa de enolização é mais baixa. Em pH ácido a frutose é até cinco vezes mais reativa do que a glicose e valores mais altos para a proporção de frutose:glicose proporcionam uma aceleração na reação e maiores concentrações de HMF. Outra razão é que a frutose forma uma mistura de difrutoses e dianidridos e, com isso, bloqueia a maioria dos grupos reativos, levando a formação de subprodutos. Enquanto a glicose forma oligossacarídeos que contêm grupos redutores reativos, apresentando um maior risco de polimerização cruzada com os intermediários reativos, incluindo HMF (SHAPLA *et al.*, 2018).

A concentração de HMF em alimentos frescos ou naturais geralmente é muito baixa, mas tem tendência a aumentar quando o alimento é submetido a aquecimento ou armazenado por longos períodos (MORTAS *et al.*, 2017; NIQUET-LÉRIDON *et al.*, 2015). Os tipos de carboidratos e aminoácidos presentes, o pH do meio, temperatura, umidade, presença de cátions divalentes e condições de armazenamento mostraram ser parâmetros que afetam a formação de HMF no alimento (KAVOUSI *et al.*, 2015; NGUYEN *et al.*, 2016). Um aumento na

concentração de HMF nos alimentos indica uma degradação de nutrientes essenciais, como carboidratos. Íons como manganês, zinco, magnésio e ferro (II) foram relatados com efeito positivo para a formação de HMF em mel (ANAM; DART, 1995). Mesmo em baixas temperaturas sob condições ácidas é possível observar formação de HMF nos alimentos, porém altas temperaturas e longos períodos de armazenamento aumentam sua concentração em uma extensão ainda maior (SHAPLA *et al.*, 2018). Portanto, o HMF é um importante marcador de modificações químicas que ocorrem no alimento e sua determinação pode ser utilizada como um parâmetro para indicar o grau de degradação e avaliar a qualidade do alimento (MORTAS *et al.*, 2017; NIQUET-LÉRIDON *et al.*, 2015).

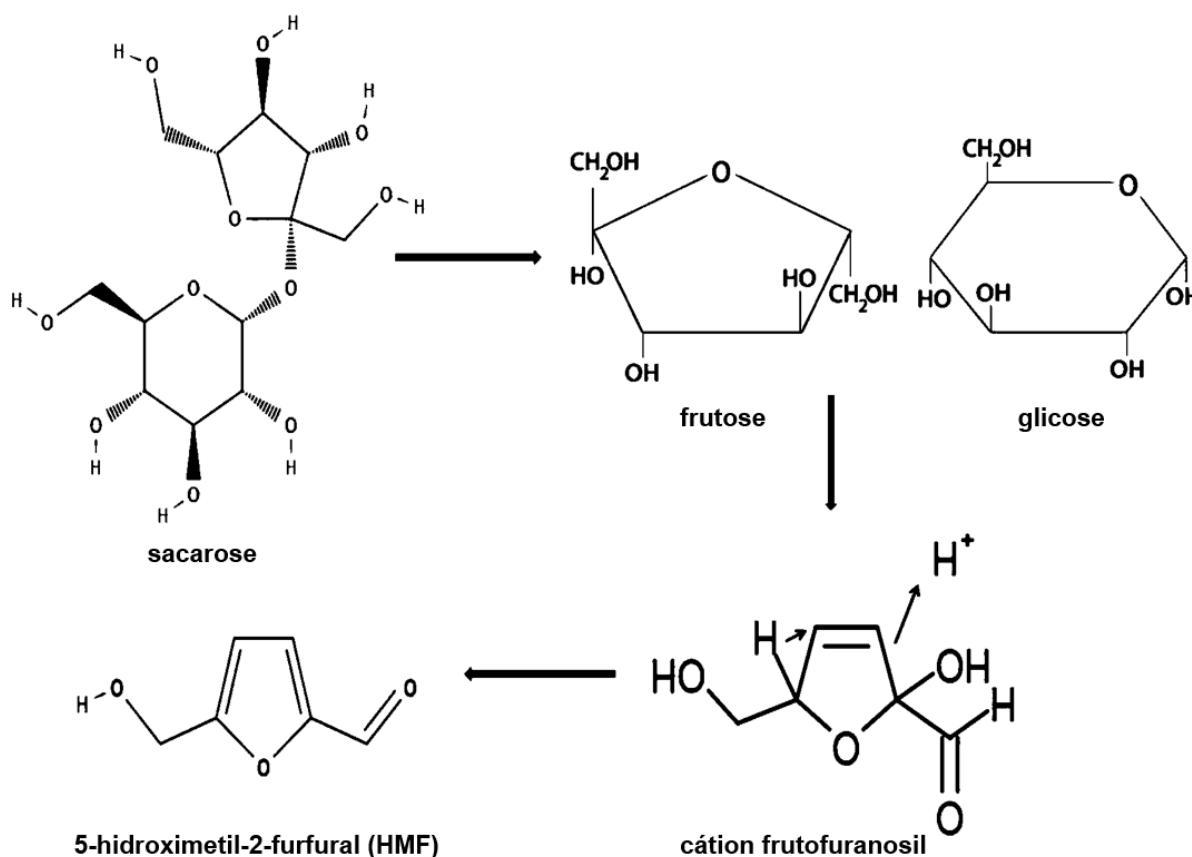


Figura 43 – Decomposição de açúcares em altas temperaturas para formação de HMF

Fonte: Adaptada de Choudhary *et al.* (2020).

O HMF é um componente indesejável em mel, formado em quantidades elevadas nesse alimento durante o aquecimento inadequado e armazenamento prolongado. Um alto conteúdo de HMF em mel pode também ser indicador de adulteração, uma vez que o HMF é produzido pelo aquecimento de xaropes de

açúcar na presença de um ácido para inversão da sucrose. Portanto, regulamentações em diferentes países recomendam um valor específico que a concentração de HMF no mel não deve exceder (CHERNETSOVA; MORLOCK, 2012).

Não existe uma estratégia em particular para reduzir a formação de HMF em alimentos devido aos inúmeros precursores e tipos de reações envolvidos. Entretanto, devido à preocupação com os efeitos toxicológicos do HMF, estratégias têm sido propostas para manter suas concentrações o mais baixas possíveis nos alimentos ou para remover ou decompor as moléculas formadas (CHOUDHARY *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2011). Entre elas, alterações na formulação dos alimentos, com adição de compostos como bicarbonato de amônio, fosfato, ácido ascórbico em combinação com aminoácidos, açúcares e lipídeos, redução do impacto do tratamento térmico e aplicação de irradiação gama foram sugeridas para evitar a formação de HMF, enquanto tratamento à vácuo ou fermentação são alguns dos procedimentos que tem sido utilizados para remover as moléculas já formadas no produto (ANESE; BOT; SUMAN, 2014; ANESE; SUMAN, 2013; GÜLCAN *et al.*, 2020).

Abu-Bakar, Makahleh e Saad (2014) detectaram HMF em amostras de suco industrializado de maçã em concentração de 17 mg L⁻¹, Lee *et al.* (2014) detectaram HMF entre 0,08 mg L⁻¹ em suco de maçã e de 91,5 mg L⁻¹ em suco de tamarindo, valores acima de limites legais de 5 a 10 mg L⁻¹ de HMF estabelecido para sucos (LEE *et al.*, 2014). Condições inadequadas de armazenamento e longos períodos de aquecimento durante o processo de produção foram sugeridas como possíveis causas para esses resultados (LEE *et al.*, 2014). Câmara, Alves e Marques (2006) detectaram HMF em vinho em concentração na faixa de 0,7 a 100 mg L⁻¹; em amostras submetidas à aquecimento excessivo de 55 °C, HMF alcançou concentração de 1,2 g L⁻¹ (PEREIRA *et al.*, 2011). Em chá, HMF aumentou de 1 para 86 mg kg⁻¹ quando aquecido à 55 °C (PÉREZ-BURILLO *et al.*, 2019). HMF também foi detectado em concentração na faixa de 406 – 2121 mg kg⁻¹ e de 109 – 893 mg kg⁻¹ em xaropes de milho e cana, respectivamente (ANDRADE *et al.*, 2016). Entre produtos de padaria, HMF foi detectado em menor concentração em bolo, de 3,0 mg kg⁻¹ e em maior concentração em biscoito, com 7,8 mg kg⁻¹ (PETISCA *et al.*, 2014), em cereais foi determinado entre 6 e 134 mg kg⁻¹ (GARCÍA-VILLANOVA *et al.*, 1993) e em pão com 17 mg kg⁻¹ (GÜLCAN *et al.*, 2020). Em mel, HMF foi encontrado em

concentrações entre 18 e 94 mg kg⁻¹ (GOMES *et al.*, 2010), de 12 a 127 mg kg⁻¹ (RIZELIO *et al.*, 2012) e entre 238 e 695 mg kg⁻¹ em mel submetido a tratamento térmico (BILUCA *et al.*, 2014). Amostras de mel armazenadas por mais de 12 meses apresentaram concentrações de HMF acima do limite recomendado de 80 mg kg⁻¹ (KHALIL; SULAIMAN; GAN, 2010). Coco *et al.* (1995) encontraram concentrações de 2,62 à 7,30 10⁻⁵ mol L⁻¹ de HMF em amostras de cerveja. Em frutas secas, concentração de HMF foi encontrada entre 30 mg kg⁻¹ em damasco e 2200 mg kg⁻¹ em ameixa (MURKOVIC; PICHLER, 2006). Em manteiga, HMF foi determinado com até 100 mg kg⁻¹ após aquecimento (NIQUET-LÉRIDON *et al.*, 2015).

No café, a formação de HMF acontece mais intensamente durante os estágios iniciais de torrefação, mas diminui quando atinge os estágios de torrefação média e forte (CHOUDHARY *et al.*, 2020; MACHEINER *et al.*, 2021). Um estudo com diferentes espécies de café mostrou uma maior degradação de HMF em sementes torradas à 225 °C em comparação com sementes torradas à 215 °C, pois a formação de HMF a partir da desidratação da frutose acontece em uma faixa específica de temperatura, e à uma temperatura acima dela ocorre uma rápida degradação do HMF (VIGNOLI *et al.*, 2014). A análise de HMF foi utilizada como parâmetro para avaliar os graus de torrefação de sementes de café, apresentando um aumento no início seguido por um característico declínio (MACHEINER *et al.*, 2021). Concentração de HMF em café aumentou de 350 para um máximo de 909 mg kg⁻¹ após torrefação por 3 minutos à 240 °C (MURKOVIC; BORNIK, 2007). A concentração de HMF também aumenta com o aumento na concentração de açúcar e com o aumento na temperatura da água utilizada no preparo do café (MORTAS *et al.*, 2017). Após a fermentação, a concentração de HMF em diferentes sementes de café teve um aumento de 73 à 225 % (MORTAS *et al.*, 2017). Além disso, HMF foi utilizado como um dos compostos para caracterizar cafés de acordo com suas variedades, origens e modo de preparo (ALBOUCHI; MURKOVIC, 2019; CIARAMELLI; PALMIOLI; AIROLDI, 2019) e foi um dos parâmetros utilizados para verificar potenciais adulterações entre café arábica e robusta (OKARU *et al.*, 2020).

6.2.2 HMF na saúde e legislação nos alimentos

O HMF é facilmente absorvido a partir dos alimentos pelo trato gastrointestinal e, ao ser metabolizado em diferentes produtos, é excretado pela urina. No

organismo, HMF é oxidado a ácido 5-hidroxiacetilfuróico ou conjugado com glicina, levando a formação de glicina 5-(hidroxiacetil)-2-furfural. Subsequentemente, uma oxidação adicional ocorre e produz ácido 2,5-furandicarboxílico. A concentração de glicina é a etapa limitante por esse caminho (FARAG *et al.*, 2020).

Ainda não há uma conclusão definitiva sobre a ação do HMF na saúde humana, pois tanto efeitos deletérios quanto efeitos positivos tem sido associados à ele (SHAPLA *et al.*, 2018). Alguns estudos reportaram efeitos benéficos do HMF relacionados a propriedades antialérgicas, anti-inflamatórias e antioxidantes. O HMF reduziu os níveis de espécies de oxigênio reativo e de malonaldeído no sangue de ratos. A atividade de remoção de espécies de oxigênio reativo pelo HMF está relacionada à sua estrutura, que inclui grupos funcionais reativos, como ligações duplas, oxigênio de um grupo aldeído e outro oxigênio no anel furano. Esses grupos podem atrair elétrons facilmente e eliminar os radicais livres. HMF chegou a ser demonstrado também com efeito inibidor de metástase, como inibidor de apoptose causada por estresse oxidativo, com ação anti-hipóxica e como um efetivo anticancerígeno.

Entretanto, a *International Agency for Research on Cancer* classifica os compostos de furanos, como o HMF, como possivelmente carcinogênicos para humanos (ANESE; SUMAN, 2013). Muitos estudos demonstraram que o HMF pode induzir efeitos toxicológicos e mutagênicos em células bacterianas e em ratos. Ele pode formar adutos com o DNA e promover transformações celulares em órgãos como cólon, fígado, rim e pele. A ingestão de quantidades elevadas de HMF também foi relacionada à irritação de mucosas, pele, olhos e trato respiratório. Atua ainda como um mutagênico indireto, pois tem o 5-sulfoximetilfurfural como um de seus metabólitos, que é reconhecido como uma substância mutagênica e indutora de tumores em pele de ratos (FARAG *et al.*, 2020). HMF também foi demonstrado como um potencial acelerador para formação de acrilamida em alimentos processados, que também é uma substância cancerígena para humanos (GÖKMEN *et al.*, 2012; GÜLCAN *et al.*, 2020). Entretanto, estudos necessários para demonstrar o potencial risco da associação de HMF com câncer em humanos ainda não foram realizados. Sendo assim, uma conclusão final sobre a atividade toxicológica e mutagênica desta molécula ainda não foi totalmente definida (QUARTA; ANESE, 2012).

As células respondem de formas diferentes aos efeitos citotóxicos do HMF e fatores como níveis de receptores, metabolismo, biotransformação, excreção e atividades enzimáticas influenciam na resposta celular. Níveis seguros para o consumo de HMF dependem das funções individuais do organismo, como ainda há um número limitado de estudos toxicológicos, os limites de ingestão ainda não estão bem estabelecidos. Em estudos pré-clínicos não foram observados efeitos tóxicos para doses diárias de ingestão de HMF variando de 80 a 100 mg por kg de peso corporal humano e foi concluído que não caracterizam risco à saúde (SHAPLA *et al.*, 2018). Também foi demonstrada total excreção de HMF pela urina dentro de 48 horas após a administração oral de 240 mg por dia (HUSØY *et al.*, 2008; SHAPLA *et al.*, 2018).

A taxa de ingestão diária individual de HMF é estimada entre 30 e 150 mg por kg de peso corporal, proveniente de um grande número de fontes de alimentos e bebidas (CHOUDHARY *et al.*, 2020; SHAPLA *et al.*, 2018). Na dieta alimentar, o café é um dos principais responsáveis pelas ingestões diárias de HMF, sendo estimado que ele contribui com cerca de 63 % para essa exposição. Grande contribuição também é atribuída ao consumo de pães, cereais e leite (CHOUDHARY *et al.*, 2020; FARAG *et al.*, 2020; HUSØY *et al.*, 2008; RUFÍAN-HENARES; DE LA CUEVA, 2008; SHAPLA *et al.*, 2018).

A concentração de HMF é amplamente reconhecida como um parâmetro que afeta a qualidade do mel, pois normalmente está ausente, ou presente em quantidades muito pequenas, no mel fresco e a concentração tende a aumentar durante o processamento com excesso de aquecimento, devido ao envelhecimento e às condições precárias de armazenamento ou, ainda, em caso de adulteração (SHAPLA *et al.*, 2018). Limites legais para a concentração de HMF em alimentos são estabelecidos apenas para mel e variam de acordo com especificações de cada país, sendo o valor de 40 mg kg⁻¹ a concentração máxima e 80 mg kg⁻¹ a concentração máxima para mel de regiões tropicais (CHOUDHARY *et al.*, 2020; FARAG *et al.*, 2020; SHAPLA *et al.*, 2018).

6.2.3 Métodos analíticos para determinação de HMF em alimentos

A *International Honey Commission* (IHC) recomenda três métodos principais para determinação de HMF, sendo dois espectrométricos que utilizam as reações de White e Whickler e um método por cromatografia líquida (HPLC).

O método espectrométrico proposto por White utiliza uma solução de mel e reação com 0,1 % de bisulfato de sódio (WHITE, 1979). Apesar de ser um método rápido e simples, ele apresenta baixas seletividade e sensibilidade (WHITE, 1979).

O método de Whickler utiliza solução de mel com *p*-toluidina e ácido barbitúrico. Nesse método são utilizadas quantidades elevadas de reagentes e grandes volumes de solução, gerando uma grande quantidade de resíduos. Além disso, a *p*-toluidina é um composto de alto potencial carcinogênico (ZAPPALÀ *et al.*, 2005).

Embora seja um método relativamente caro, o HPLC apresenta inúmeras vantagens frente aos métodos espectrométricos e é o método mais amplamente empregado para determinação de HMF em amostras de alimento. Na descrição das metodologias oficiais para determinação de HMF em mel por HPLC, não é requerido um tratamento prévio da amostra para a injeção no equipamento, apenas uma filtração. Entretanto, para evitar que ocorra uma possível degradação do HMF por algum outro componente presente no mel, a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) recomenda que seja realizado um preparo de amostra com soluções de Carrez I e Carrez II, que consistem em soluções dos sais ferrocianeto de potássio tri-hidratado ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) e de acetato de zinco di-hidratado ($Zn(CH_3CO_2)_2 \cdot 2H_2O$), respectivamente (AOAC, 1980).

Cromatografia gasosa também foi reportada para análise de HMF em amostras de mel, suco de laranja, geleia, cereais e biscoitos. Entretanto, como o HMF é formado durante o tratamento térmico de alimentos, a aplicação de calor à amostra para injeção no sistema de GC pode levar a formação desse produto e interferir na análise, portanto, esse método não é muito recomendado para análise de HMF (TEIXIDÓ *et al.*, 2006).

Métodos eletroquímicos apresentam vantagens sobre métodos cromatográficos devido ao seu baixo custo, rapidez, facilidade de operação e alta sensibilidade (SALHI; SAMET; TRABELSI, 2020). Entre métodos eletroanalíticos, eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*) é a técnica mais

utilizada para determinação de HMF. Voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*) e voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) foram avaliadas para análise de HMF, sendo que SWV apresentou melhores sensibilidade e reprodutibilidade e foi escolhida para determinação de HMF em amostra de mel e xarope (SALHI; SAMET; TRABELSI, 2020). Para a CV e a SWV, eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês *Glassy Carbon Electrode*) foi utilizado como eletrodo de trabalho e as medidas voltamétricas foram realizadas entre 0 e -2 V em solução de Na₂SO₄ com uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Polarografia de pulso diferencial também foi proposta para determinação de HMF em mel. Nesse método uma redução de sinal foi detectada em -1100 mV versus Ag/AgCl e avaliou-se que entre possíveis eletrólitos de suporte, borato foi o mais adequado para determinação de HMF em mel (REYES-SALAS *et al.*, 2006).

No Quadro 4 estão identificadas algumas técnicas de análise e preparo de amostras, e seus respectivos limites de detecção e quantificação (quando disponíveis), reportadas na literatura para determinação de HMF em diferentes matrizes alimentares.

Quadro 4 – Técnicas de análise e procedimentos de extração reportados na literatura para determinação de HMF em matrizes alimentares

Técnica de análise	Preparo de amostra	Limite de detecção	Limite de quantificação	Matriz	Referência
espectrometria	Carrez I e II	-	-	mel	(GOMES <i>et al.</i> , 2010)
espectrometria	Carrez I e II	0,22 mg kg ⁻¹	0,67 mg kg ⁻¹	mel	(TRUZZI <i>et al.</i> , 2012)
HPLC-UV	-	30 ng kg ⁻¹	-	cereais	(GARCÍA-VILLANOVA <i>et al.</i> , 1993)
HPLC-UV	-	0,27 mg kg ⁻¹	0,83 mg kg ⁻¹	mel	(TRUZZI <i>et al.</i> , 2012)
HPLC-UV	-	1,22 mg kg ⁻¹	3,68 mg kg ⁻¹	vinho	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2011)
HPLC-UV	-	0,11 mg kg ⁻¹	0,35 mg kg ⁻¹	café	(ALBOUCHI; MURKOVIC, 2019)
HPLC-UV	-	0,05 mg kg ⁻¹	0,15 mg kg ⁻¹	açúcar	(POLOVKOVÁ; ŠIMKO, 2017)
HPLC-UV	SALLE	0,68 mg kg ⁻¹	2,00 mg kg ⁻¹	mel	(CHEN <i>et al.</i> , 2019b)
HPLC-UV	Carrez I e II	0,34 mg kg ⁻¹	1,03 mg kg ⁻¹	café	(MORTAS <i>et al.</i> , 2017)
HPLC-UV	Carrez I e II	-	-	molho e biscoito	(ANESE; BOT; SUMAN, 2014)
HPLC-UV	Carrez I e II	24 ng kg ⁻¹	79 ng kg ⁻¹	milho	(MASATCIOGLU; NG; KOKSEL, 2015)
HPLC-UV	-	0,1 ng kg ⁻¹	0,6 ng kg ⁻¹	chá	(PÉREZ-BURILLO <i>et al.</i> , 2019)
HPLC-UV	SPE	35 ng kg ⁻¹	120 ng kg ⁻¹	café e frutas secas	(MURKOVIC; PICHLER, 2006)
HPLC-UV	-	21 mg kg ⁻¹	73 mg kg ⁻¹	café	(MURKOVIC; BORNIK, 2007)
HPLC-UV	Carrez I e II	-	4 mg kg ⁻¹	café	(ARRIBAS-LORENZO; MORALES, 2010)
HPLC-UV	LLE	1,2 ng kg ⁻¹	41 ng kg ⁻¹	farinha e óleo	(AKPINAR <i>et al.</i> , 2011)
HPLC-UV	LLE	0,46 ng kg ⁻¹	1,40 ng kg ⁻¹	suco	(LEE <i>et al.</i> , 2014)
HPLC-UV	-	-	1 mg kg ⁻¹	biscoito	(NGUYEN <i>et al.</i> , 2016)
HPLC-UV		0,0048 µg L ⁻¹	0,0159 µg L ⁻¹	leite	(ER DEMIRHAN <i>et al.</i> , 2015)
HPLC-UV	Carrez I e II	-	-	pão	(GÜLCAN <i>et al.</i> , 2020)
HPLC-UV	Carrez I e II	-	-	café	(HAMZALIOĞLU; GÖKMEN, 2020)

Técnica de análise	Preparo de amostra	Limite de detecção	Limite de quantificação	Matriz	Referência
HPLC-UV	SPE	-	7 ng mL ⁻¹	vários	(HUSØY <i>et al.</i> , 2008)
HPLC-UV	Carrez I e II	-	-	manteiga	(NIQUET-LÉRIDON <i>et al.</i> , 2015)
UHPLC-UV	Carrez I e II	0,69 ng kg ⁻¹	2,29 ng kg ⁻¹	café	(MACHEINER <i>et al.</i> , 2021)
UHPLC-UV-MS/MS	-	0,06 mg L ⁻¹	0,18 mg L ⁻¹	vinho	(SERRA-CAYUELA <i>et al.</i> , 2013)
HPLC-MS	QuEChERS	0,33 mg kg ⁻¹	1,00 mg kg ⁻¹	mel	(TOMASINI <i>et al.</i> , 2012)
GC-MS	SPE	12 µg kg ⁻¹	39 µg kg ⁻¹	vários	(TEIXIDÓ <i>et al.</i> , 2006)
RMN	-	6,3 mg kg ⁻¹	22,9 mg kg ⁻¹	café	(OKARU <i>et al.</i> , 2020)
RMN	--	-	-	café	(CIARAMELLI; PALMIOLI; AIROLDI, 2019)
CE	SPE	0,7 mg kg ⁻¹	2,5 mg kg ⁻¹	vários	(TEIXIDÓ <i>et al.</i> , 2011)
CE	-	3,37 mg kg ⁻¹	11,24 mg kg ⁻¹	mel	(RIZELIO <i>et al.</i> , 2012)
CE	-	0,09 mg kg ⁻¹	0,31 mg kg ⁻¹	mel	(BILUCA <i>et al.</i> , 2014)
polarografia	-	48 ng kg ⁻¹	-	mel	(REYES-SALAS <i>et al.</i> , 2006)
AMTC-PAD	SPE	0,10 mg L ⁻¹	0,30 mg L ⁻¹	bebidas	(XU <i>et al.</i> , 2015)
SWV	-	0,006 mg L ⁻¹	0,02 mg L ⁻¹	mel e xarope	(SALHI; SAMET; TRABELSI, 2020)
CV	-	25 ng L ⁻¹	83,3 ng L ⁻¹	água	(SALHI; SAMET; TRABELSI, 2020)

Fonte: Elaborado pela Autora (2021).

Nota:

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

AMTC-PAD: Amino Trap Column-Pulsed Amperometric Detection

6.2.4 Sensores eletroquímicos

Um sensor químico é um dispositivo que está continuamente fornecendo informações sobre o ambiente ao seu redor. São compostos por um transdutor, que transforma a resposta em um sinal detectável na instrumentação analítica, e uma camada química seletiva, que isola a resposta do analito do seu ambiente imediato. Idealmente, um sensor químico fornece uma resposta relacionada à quantidade de uma espécie química específica (AHMAD *et al.*, 2019). De acordo com a propriedade que será determinada podem ser classificados em sensores elétricos ou eletroquímicos, ópticos, de massa ou térmicos. Os sensores eletroquímicos chamam a atenção pela sensibilidade, simplicidade do procedimento experimental, baixo custo e potencial de aplicação em diferentes áreas, como análises clínicas, industriais, ambientais e agrícolas (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003).

Sensores eletroquímicos podem medir propriedades como corrente, potencial, condutividade, impedância e capacitância (AHMAD *et al.*, 2019). Nos sensores potenciométricos é estabelecido um equilíbrio na interface do sensor e resposta é dada pela diferença de potencial entre dois eletrodos quando a corrente é zero. Nos sensores condutométricos é medida a condutividade do analito em frequências diferentes. Sensores voltamétricos e amperométricos são baseados no potencial aplicado entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho, que leva a oxidação ou redução de uma espécie eletroativa e gera uma corrente que é proporcional à concentração do analito. Os sensores voltamétricos medem o valor da corrente em um potencial variado, enquanto os sensores amperométricos medem o valor da corrente em um potencial fixo (LOWDON *et al.*, 2020).

6.2.4.1 Sensores voltamétricos

Nos sensores voltamétricos ou amperométricos ocorre a transferência de elétrons do analito ou para ele. Enquanto na medida amperométrica o fluxo de corrente na célula é registrado para um único potencial aplicado, na medida voltamétrica, ocorre uma varredura do potencial de um valor predefinido para outro, sendo o valor da corrente da célula registrando em função do potencial aplicado (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003).

Medidas voltamétricas requerem um potenciostato, para controlar o potencial, e uma célula eletroquímica. A célula eletroquímica é constituída por 2 ou 3 eletrodos e por uma solução eletrolítica inerte. A solução eletrolítica mantém as forças iônicas do meio constantes e diminui a resistência da solução (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003). A reação acontece no eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência (por exemplo: Ag/AgCl , $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$) fornece um potencial estável comparado ao eletrodo de trabalho e um material inerte (como platina ou grafite) é geralmente utilizado como eletrodo auxiliar (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003).

A carga do analito de interesse é alterada na superfície do eletrodo de trabalho, pela troca de um ou mais elétrons com o condutor. Com isso, ocorre uma alteração na reação redox, que altera o valor da corrente medida. Nessa reação eletroquímica, os compostos oxidado e reduzido permanecem na solução, enquanto o condutor é quimicamente inerte e serve apenas como condutor de elétrons (MARTINS; SENTANIN; DE SOUZA, 2019).

As técnicas voltamétricas são classificadas de acordo com a maneira como o potencial é aplicado ao eletrodo, sendo elas: voltametria de pulso normal, voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*), voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*), voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) e voltametria de escada (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). DPV e SWV são muito usadas para propósitos analíticos pois tem uma eliminação superior da corrente capacitiva, que proporciona à essas técnicas uma sensibilidade comparável à técnicas cromatográficas (MARTINS; SENTANIN; DE SOUZA, 2019).

Na DPV, são aplicados pequenos pulsos de amplitude fixada em uma rampa linear de potencial. A corrente é medida antes e após a aplicação do pulso e são subtraídas, uma vez que a primeira é a contribuição da corrente capacitiva e a segunda a contribuição da corrente faradaica. O sinal resultante é registrado em função do potencial em uma rampa linear e gera um voltamograma de pulso diferencial (MARTINS; SENTANIN; DE SOUZA, 2019).

As principais vantagens da DPV incluem boa sensibilidade para detecção de espécies orgânicas e inorgânicas, compatibilidade com diferentes solventes e eletrólitos, ser adequada para o uso em uma diferentes temperaturas, proporcionar análises rápidas e possibilidade de analisar vários analitos simultaneamente (MARTINS; SENTANIN; DE SOUZA, 2019).

6.2.4.2 Eletrodos quimicamente modificados

Um eletrodo quimicamente modificado (EQM) compreende um eletrodo base e uma camada do modificador químico. Alguns materiais convencionais para eletrodos são ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme e fibras de carbono (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002). Ao introduzir um agente modificador na superfície dos EQMs são induzidas alterações no eletrodo, com o objetivo de melhorar o desempenho ou resolver problemas eletroanalíticos, como sensibilidade e seletividade (MARTINS; SENTANIN; DE SOUZA, 2019; STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003).

A imobilização de um agente modificador na superfície do eletrodo pode ocorrer através de reações químicas, quimissorção, formação de composto ou revestimento polimérico. Os EQM permitem um maior controle das características e reatividade do eletrodo, possuem uma vasta possibilidade de aplicações, como o revestimento com propriedades anticorrosivas e fotossensíveis em eletrodos semicondutores, dispositivos para o campo de eletrônicos e sensores eletroquímicos (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003).

Um método muito comum para a introdução de um agente modificador na superfície do eletrodo consiste em recobri-lo com filmes poliméricos condutores e permeáveis ao eletrólito de suporte e à espécie de interesse. Essa técnica permite a imobilização de múltiplas monocamadas na superfície e aumenta consideravelmente a resposta eletroquímica. O analito é pré-concentrado na camada polimérica e a detecção ocorre pelo seu par redox. A resposta depende da concentração da espécie eletroativa incorporada no polímero. A maioria dos polímeros são aplicados à superfície do eletrodo por uma combinação de atração adsortiva e baixa solubilidade na solução eletrolítica, usando polímeros pré-formados ou polimerização eletroquímica (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003). A modificação na superfície do eletrodo usando eletropolimerização produz uma camada de reconhecimento uniforme, reproduzível e controlável (ROHANI; MOHADESI; ANSARI, 2019).

Polímeros Molecularmente Impressos (MIP) são promissores modificadores de eletrodos para desenvolvimento de sensores capazes de detectar seletivamente numerosos compostos presentes em baixa concentração em matrizes alimentares e ambientais (MORO *et al.*, 2019).

6.2.4.2.1 Polímeros Molecularmente Impressos

Polímeros Molecularmente Impressos (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*) são receptores poliméricos que se ligam a analitos específicos por interações químicas, similarmente aos mecanismos de ligação entre anticorpos e antígenos. De maneira análoga a esse mecanismo, o antígeno atua como a molécula molde (*template*) ao redor da qual os anticorpos (matriz polimérica) são modelados, gerando configurações complementares com alta afinidade e seletividade. Esses materiais também podem ser designados como anticorpos plásticos ou polímeros biomiméticos, por serem inspirados em uma criação da natureza.

Na impressão molecular os monômeros funcionais podem ser polimerizados ao redor de uma molécula molde (*template*). Para iniciar a reação de polimerização, a molécula deve sofrer uma quebra em sua estrutura e, para que isso ocorra, é necessário algum estímulo físico, como aumento da temperatura, incidência de radiação UV ou passagem de corrente elétrica. Após a polimerização, as moléculas do *template* podem ser removidas do polímero por decomposição química ou extração com solvente. Dessa forma, é formada uma matriz polimérica tridimensional com cavidades que são complementares à molécula de *template* em forma, tamanho e funcionalidade química e permitem uma ligação seletiva dessas moléculas (CUI *et al.*, 2020). O procedimento da síntese de MIPs está ilustrado na Figura 44.

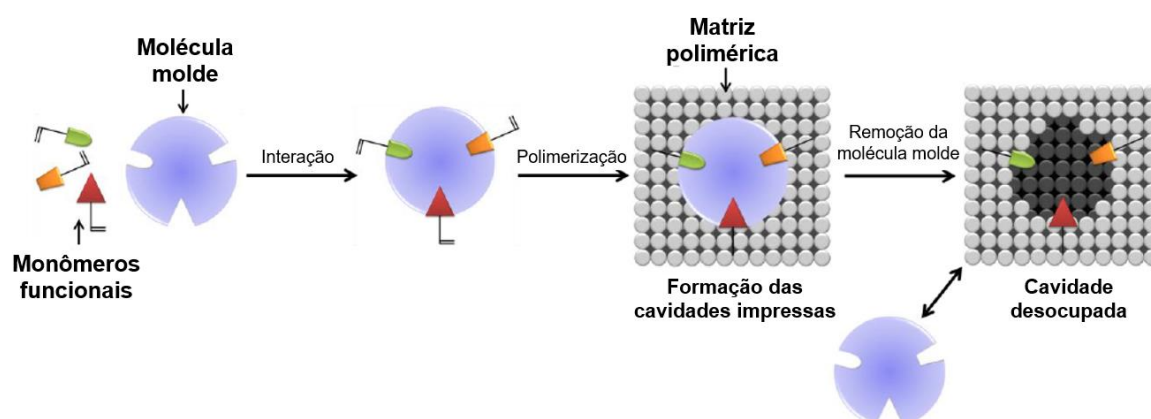


Figura 44 – Representação esquemática da síntese de polímeros molecularmente impressos (MIP)

Fonte: adaptada de Haupt *apud* Foguel (2015).

MIPs possuem diferentes áreas de aplicação, incluindo técnicas de separação e purificação, sensores e biossensores, catálises, sorbente para SPE e liberação controlada de drogas (LOWDON *et al.*, 2020; VASAPOLLO *et al.*, 2011).

A maioria dos sensores de MIP dependem da geração de uma resposta óptica, ou sinal eletroquímico quando os MIPs se ligam a um analito específico (MORO *et al.*, 2019). Em sensores eletroquímicos, MIPs possuem propriedades de reconhecimento e transdução. Como um elemento de reconhecimento, os MIPs podem ligar os analitos alvo especificamente e gerar um sinal químico ou físico (VASAPOLLO *et al.*, 2011). Como transdutores, traduzem a ligação do analito em um sinal mensurável, como potencial, corrente, condutividade ou alteração de impedância, para detecção (LOWDON *et al.*, 2020).

As moléculas alvo se encaixam aos sítios de ligação formados na matriz polimérica por forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio, atrações intermoleculares, interações hidrofóbicas e interação de coordenação de metais. Esse mecanismo é o mesmo proposto por Pauling para a formação de anticorpos que usam as moléculas do antígeno como *template*, o que forma as bases para o conceito de anticorpos artificiais (VASAPOLLO *et al.*, 2011).

As interações não covalentes representam o mecanismo mais simples de formação e dissociação do complexo e há uma maior disponibilidade de monômeros funcionais que podem ser usados para essa interação (VASAPOLLO *et al.*, 2011). Entretanto, a afinidade da ligação entre analito e o polímero é menor do que a de MIPs preparados com interações covalentes (VASAPOLLO *et al.*, 2011).

Quando as interações entre o *template* e monômero são covalentes fornecem sítios de ligação homogêneos na matriz polimérica e reduzem os sítios não-específicos. Entretanto, para remover o *template* da matriz polimérica é necessário que as ligações covalentes sejam quebradas (VASAPOLLO *et al.*, 2011).

Alguns parâmetros devem ser avaliados durante o desenvolvimento de um MIP, pois interferem na morfologia, propriedades e performance dos polímeros. Entre eles: o método de polimerização, o monômero, o analito, a molécula molde, o solvente, o agente reticulante e o iniciador radicalar (VASAPOLLO *et al.*, 2011).

O papel do monômero é fornecer grupos funcionais que podem formar um complexo com o *template* por interações covalentes ou não-covalentes. Monômeros funcionais tipicamente usados para o preparo de MIP são ácido metacrílico, ácido acrílico, ácido vinilbenzóico, pirrol, *o*-aminofenol, *o*-fenilenodiamina, ácido *p*-

aminobenzóico, anilina, dopamina, ácido gálico, *p*-aminotiofenol, ácido *p*-aminobenzenosulfônico, ácido *p*-amino benzóico, entre outros (GONÇALVES, 2021; VASAPOLLO *et al.*, 2011).

A molécula molde (*template*) deve ser avaliada quanto a presença de grupos capazes de se ligar aos monômeros funcionais. Essa molécula, entretanto, não deve possuir grupos que acelerem ou retardem a reação de polimerização. Usualmente o *template* é o próprio analito. A interação *template* e monômero é governada por um processo de equilíbrio, por isso quantidades superiores do monômero em relação ao número de mols do analito devem ser empregadas com o objetivo de deslocar o equilíbrio no sentido de favorecer a formação de uma maior quantidade de complexos *template*-monômero. O tamanho da molécula molde, seja o *template* ou o analito, influencia na seletividade dos MIPs. Moléculas que possuem grupos estéricos grandes e distantes da função orgânica do analito que se liga ao monômero produzem polímeros pouco seletivos. A remoção do *template* também é uma etapa que pode interferir no desenvolvimento do MIP, pois a remoção do *template* pode não ocorrer ou pode causar danos ao MIP. Essa etapa pode ser realizada por solvente ou de forma eletroquímica (GONÇALVES, 2021). A ligação do analito ao MIP depende ainda de vários fatores, como seletividade, área superficial, tempo de contato, temperatura, solubilidade, pH e capacidade de adsorção (GONÇALVES, 2021; VASAPOLLO *et al.*, 2011).

MIPs podem ser preparados em uma variedade de formas físicas e usando diferentes métodos, dependendo da sua aplicação final. Uma abordagem comum consiste em sintetizar MIPs em *bulk* (massa), formando um bloco polimérico (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). Em seguida, o polímero é moído e as partículas peneiradas nas faixas de tamanho desejadas de acordo com a aplicação. A moagem e peneiração tornam esse método demorado e muitas vezes as partículas produzidas possuem tamanho e forma irregulares. Além disso, alguns sítios de interação são destruídos durante a moagem, reduzindo a eficiência do MIP (VASAPOLLO *et al.*, 2011).

Outro método de preparo de MIPs é a polimerização por suspensão. Nesse procedimento, os constituintes necessários para que ocorra a reação são solubilizados em um solvente orgânico apolar. Um solvente imiscível, geralmente água, contendo um agente estabilizador para diminuir a tensão interfacial entre as duas fases, é adicionado e a solução é aquecida. São formadas partículas

poliméricas de formato esférico e tamanhos uniformes, que são separadas da fase aquosa com facilidade. A formação de partículas uniformes é uma vantagem desse método. Entretanto, quando monômeros ou analitos são muito solúveis em água pode ocorrer partição desses constituintes da fase orgânica para a fase aquosa, o que acarreta em perda do reconhecimento da molécula (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

A polimerização também pode ser realizada por precipitação. Esse método é similar à polimerização em *bulk*, porém utiliza volumes maiores de solventes com o intuito de impedir a formação de uma pasta polimérica. A síntese é induzida por luz ou aquecimento na ausência de oxigênio. A cadeia polimérica cresce continuamente até que se torna insolúvel na mistura da reação e precipita. Uma centrifugação é realizada para separar as micropartículas obtidas. Tem como vantagens a formação de partículas uniformes e bons rendimentos, superiores aos obtidos pela polimerização em *bulk* (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Os MIPs também podem ser preparados por eletropolimerização. Nesse método, primeiramente, uma solução contendo o *template* e um monômero funcional polimerizável é preparada e, em seguida, é fornecida energia química na forma de fluxo de elétrons ao sistema. O fluxo de elétrons transforma a grande quantidade de monômeros funcionais em uma espécie de tecido artificial em torno do *template* (GONÇALVES, 2021). No caso de polímeros preparados por eletropolimerização, o *template*, idealmente, deve ser inerte e estável na janela de potencial aplicado, de forma a garantir que a impressão seja do próprio analito e não de seus produtos oxidados ou reduzidos. A eletropolimerização é mais rápida que a polimerização em *bulk* e pode ser realizada *in situ* na superfície do eletrodo. Além disso, a adesão e espessura do polímero na superfície do eletrodo podem ser controlados pelas condições da eletropolimerização, como o número de ciclos voltamétricos, o potencial aplicado, a velocidade de varredura e a proporção entre monômero e *template*, isso torna os MIPs eletropolimerizados mais reproduzíveis do que os MIPs em *bulk* (ROHANI; MOHADESI; ANSARI, 2019).

Muito frequentemente, as interações entre o analito e o MIP são transduzidas em um sinal por uma técnica eletroanalítica, como DPV, SWV e espectroscopia de impedância eletroquímica. Sensores baseados em MIP para determinação de 2-furfural (2-FAL) em água e vinho foram preparados utilizando ácido metacrílico como monômero funcional e determinação com sensor óptico (CENNAMO *et al.*, 2019;

PESAVENTO *et al.*, 2020). Ácido metacrílico também foi usado como monômero funcional para desenvolver um sensor de MIP para determinar 2-FAL em vinho usando SWV para aquisição do sinal analítico com uma proporção de monômero:*template* de 4:1 (PESAVENTO *et al.*, 2021). Ácido *p*-aminobenzóico (*p*-ABA) foi eletropolimerizado na superfície de um carbono de eletrodo vítreo para formação de um MIP para determinação de diosgenina na proporção de 5:1 (monômero:*template*) com 20 ciclos voltamétricos, velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ e medidas realizadas por DPV (ROHANI; MOHADESI; ANSARI, 2019). Eletropolimerização de MIP também foi o método utilizado para desenvolvimento de um sensor para determinação de hormônios de tireoide usando *p*-ABA como monômero funcional em uma proporção monômero:*template* de 10:1 com 5 ciclos voltamétricos, velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ e medidas por SWV (PACHECO *et al.*, 2019). Um sensor para quercetina foi desenvolvido por eletropolimerização de um MIP com *p*-ABA em uma proporção de 6:1 (monômero:*template*) com 10 ciclos voltamétricos, velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ e aquisição do sinal analítico por DPV (YANG L; *et al.*, 2017). Um MIP com *p*-ABA na proporção de 5:1 (monômero:*template*) para determinação de cefquinoma em leite foi preparado por eletropolimerização com 7 ciclos voltamétricos, velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ e medidas por SWV (MORO *et al.*, 2019). 3,4-metilenodioximetanfetamina (*ecstasy*) foi determinada em urina e sangue com um sensor desenvolvido por um MIP preparado por eletropolimerização utilizando *o*-fenilenodiamina como monômero funcional em uma proporção 1:4 (monômero:*template*) com 5 ciclos voltamétricos, velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ e medidas analíticas realizadas por SWV (COUTO *et al.*, 2019).

Os MIPs são altamente específicos e seletivos ao analito alvo, são adequados para aplicação em uma grande variedade de analitos, são resistentes a ambientes adversos, como meios ácidos e básicos, presença de íons metálicos, solventes orgânicos, altas temperaturas e alta pressão, além disso representam um método rápido e fácil para se trabalhar e tem um baixo custo quando comparado à outras técnicas de análise (LOWDON *et al.*, 2020).

Algumas desvantagens reportadas durante o desenvolvimento de MIPs são que as cavidades formadas podem não ser suficientemente seletivas e interagir com outros interferentes semelhantes ao analito. Em alguns casos pode não haver uma diferença do sinal entre o MIP e o NIP (polímero de controle sintetizado de forma

análoga ao MIP, porém sem a molécula molde), o que indica que apenas uma adsorção do analito deve ocorrer no polímero e não uma interação específica com as cavidades do MIP (GONÇALVES, 2021). Baixa reprodutibilidade também é um problema frequentemente relatado em análises com MIPs.

6.3 Objetivos

- Desenvolver um método para analisar HMF em amostras de café utilizando a técnica SALLE para extração do analito e sensor eletroquímico (MIP) para detecção
- Desenvolver um sensor eletroquímico baseado em um polímero molecularmente impresso (MIP) para determinação de HMF, utilizando ácido *p*-aminobenzóico (*p*-ABA) como monômero funcional e HMF como molécula molde
- Avaliar a eficiência e otimizar a técnica SALLE para extração de HMF de amostras de café
- Realizar a validação do procedimento analítico proposto utilizando MIP e SALLE para determinação de HMF
- Empregar o método com MIP e SALLE MIP para determinação de HMF em amostras de café em pó e café instantâneo

6.4 Parte Experimental

Nesta seção são descritos os procedimentos realizados para a otimização dos parâmetros de eletropolimerização do MIP e das condições da SALLE para determinação de HMF em amostras de café por voltametria.

6.4.1 Reagentes e amostras

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada (ultrapura) de resistividade maior que 18,2 MΩ cm e temperatura de 25 °C. Hexacianoferrato (III) de potássio, hexacianoferrato (II) tri-hidratado de potássio, óxido de alumínio, cafeína, 2-furfural, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio

monobásico, ácido *p*-aminobenzóico (*p-aminobenzoic acid* – *p*-ABA) e acetonitrila (ACN) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Cloreto de potássio e carbonato de sódio foram adquiridos pela Reagen. Cloreto de sódio foi adquirido pela Synth e 5-hidroximetilfurfural (HMF) pela Oakwood Chemical.

A solução tampão de fosfato de sódio (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Solution*) de concentração $0,17 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) foi preparada usando fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monobásico.

6.4.2 Equipamento

Medidas voltamétricas, como voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial foram realizadas com potenciostato AUT86702 operado com *software* NOVA, versão 2.1.4 (Metrohm, Herisau, Switzerland).

O sistema eletroquímico utilizado consiste em um eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês *Glassy Carbon Electrode*), um contra eletrodo de haste de grafite e um eletrodo de referência (Ag|AgCl) em solução saturada de KCl, todos adquiridos pela Microtube (Araraquara, Brasil).

6.4.3 Preparação do MIP na superfície do eletrodo

Para a preparação do MIP, inicialmente um GCE comercial foi mecanicamente polido em Al_2O_3 , lavado com água ultrapura e secado em corrente de N_2 . Para a síntese do MIP, foi preparada uma solução de polimerização com 6 mmol L^{-1} de *p*-ABA (monômero) e 1 mmol L^{-1} de HMF (*template*) em PBS pH 7,4. Subsequentemente, o eletrodo foi imerso nessa solução e a polimerização foi realizada com 10 ciclos voltamétricos entre $-2,0 \text{ V}$ e $+1,2 \text{ V}$ à uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Após a polimerização, o GCE foi imerso e mecanicamente agitado em solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por 2,5 minutos à temperatura ambiente para a remoção das moléculas alvo da superfície do eletrodo. O GCE foi lavado em água ultrapura, secado em corrente de N_2 e imerso em uma solução de incubação, onde permaneceu por 45 minutos, para permitir a ligação do analito na superfície do eletrodo. As soluções de incubação eram compostas por padrões de HMF em PBS

pH 7,4 ou por alíquotas preparadas a partir das amostras de café diluídas em PBS pH 7,4, após extração por SALLE.

Após transcorrido o tempo de incubação, o HMF contido na superfície do GCE foi quantificado pela medida do sinal da corrente de redução do HMF em NaOH 0,1 mol L⁻¹ por voltametria de pulso diferencial (DPV) de -1,3 V para -1,6 V. De forma similar a proposta por SILVA (2013).

Paralelamente, um polímero molecularmente não impresso (NIP, do inglês *Non-Imprinted Polymer*) foi preparado como um controle, de forma análoga ao MIP, porém sem a presença da molécula alvo. Para isso, foi realizada a eletropolimerização de uma solução 6 mmol L⁻¹ do monômero (*p*-ABA) preparado em PBS pH 7,4 no GCE com 10 ciclos voltamétricos entre -2,0 V e +1,2 V à uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. O eletrodo foi imerso em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e agitado mecanicamente por 2,5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o GCE foi lavado com água ultrapura, secado em corrente de nitrogênio e imerso em uma solução de incubação contendo padrão de HMF preparado em PBS pH 7,4 por 45 minutos. Da mesma forma que com o MIP, a intensidade da corrente foi medida em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ por DPV.

6.4.4 Procedimento de SALLE para extração de HMF

Para o procedimento de extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE), primeiramente, 0,04 g de amostras de café foram pesadas em um *Eppendorf* e 1 mL de solução de ACN:PBS, na proporção de 70:30, foi adicionada. A solução no tubo foi agitada em vórtex por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 0,02 g de NaCl e a solução foi centrifugada por 10 minutos a 2000 x g (6000 rpm). Após centrifugação, uma alíquota de 0,3 mL do sobrenadante foi retirada e diluída para 5 mL com PBS pH 7,4, para ser utilizada como solução de incubação. O GCE, após polimerização e remoção da molécula de *template*, foi imerso nessa solução de incubação por 45 minutos.

Com o objetivo de determinar a melhor proporção de ACN:PBS e a quantidade de NaCl que proporcionariam a melhor condição para a extração do HMF das amostras, as soluções de ACN:PBS foram preparadas nas proporções de 30:70, 50:50, 60:40 e 70:30 e NaCl foi adicionado nas quantidades de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg. O sal Na₂CO₃ também foi avaliado, nas mesmas quantidades de NaCl,

como um possível eletrólito para promover o efeito *salting-out*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

6.4.5 Caracterização do MIP de *p*-ABA

O MIP formado pela eletropolimerização de *p*-ABA na presença de HMF foi caracterizado por voltametria cíclica com uma solução aquosa contendo a sonda redox. A sonda redox é composta por 2,5 mmol L⁻¹ de K₄Fe(CN)₆ e 2,5 mmol L⁻¹ de K₃Fe(CN)₆ em 0,5 mol L⁻¹ de KCl. A voltametria cíclica foi registrada após cada etapa do desenvolvimento do MIP: no eletrodo totalmente polido e eletroquimicamente limpo, após a eletropolimerização do MIP na superfície do eletrodo, após a remoção do *template* do MIP e após a incubação do eletrodo em uma solução contendo o analito de interesse (HMF).

A voltametria cíclica para a caracterização do MIP pela sonda redox foi realizada de -0,6 V à +0,8 V com uma velocidade de varredura de 0,05 V s⁻¹ e 1 ciclo voltamétrico.

6.4.6 Avaliação dos parâmetros analíticos do método proposto

Para a construção da curva de calibração, foram preparadas soluções padrão de HMF em diferentes concentrações e as amostras foram submetidas ao procedimento de extração por SALLE e análise por MIP descritos nas seções anteriores. As soluções padrão foram preparadas de forma que as concentrações de HMF na solução de incubação fossem iguais à 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mg L⁻¹, em PBS pH 7,4.

Uma curva com adição de padrão foi construída para verificar a interferência da matriz no sinal obtido pelas análises. Para os experimentos com adição de padrão, 0,04 g de amostra de café instantâneo foram pesados no frasco *Eppendorf* e alíquotas de solução padrão com diferentes concentrações de HMF, preparados em PBS, foram adicionadas ao frasco de reação e submetidas ao procedimento de extração por SALLE e análise por MIP, conforme descritos nas seções anteriores. As soluções padrão foram preparadas de forma que as concentrações de HMF na solução de incubação fossem iguais à 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mg L⁻¹, em PBS pH 7,4.

A repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação do método foram avaliadas pela análise de 6 amostras de café enriquecidas com solução padrão de HMF nas concentrações de 4 e 7 mg L⁻¹. A repetibilidade e a reprodutibilidade foram avaliadas pelo desvio padrão relativo obtido na análise de 6 amostras de café, preparadas no mesmo dia e em dias diferentes, respectivamente. A recuperação do método foi avaliada através da exatidão entre os resultados observados e os resultados esperados.

A seletividade foi verificada pela análise de soluções de 7 mg L⁻¹ de 2-furfural, cafeína, glicose, ácido ascórbico e metilglioxal que foram submetidas ao procedimento de extração e análise propostos.

6.5 Resultados e Discussão

Nesta seção são apresentados e analisados os resultados observados durante o desenvolvimento do procedimento experimental proposto para determinação de HMF em café utilizando SALLE e MIP.

6.5.1 Avaliação eletroquímica

Para a formação do MIP na superfície do eletrodo, foi realizada a eletropolimerização do monômero *p*-ABA na presença de HMF. *p*-ABA é amplamente utilizado na literatura como monômero para uma grande variedade de materiais e analitos, por ser facilmente eletropolimerizado e por originar filmes poliméricos com boa estabilidade química e mecânica (FERREIRA L. *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011; MORO *et al.*, 2019; PACHECO *et al.*, 2019; PERNITES *et al.*, 2011; ROHANI; MOHADESI; ANSARI, 2019; XU *et al.*, 2001; YANG S. *et al.*, 2017; ZHANG; WANG; XU, 2010). O mecanismo de reação do *p*-ABA está esquematizado na Figura 45. O *p*-ABA é primeiramente oxidado à radicais livres, esses radicais rapidamente se combinam e formam ácido hidrazobenzóico, que é oxidado à ácido azobenzóico, que por sua vez, pode ser reduzido à ácido hidrazobenzóico.

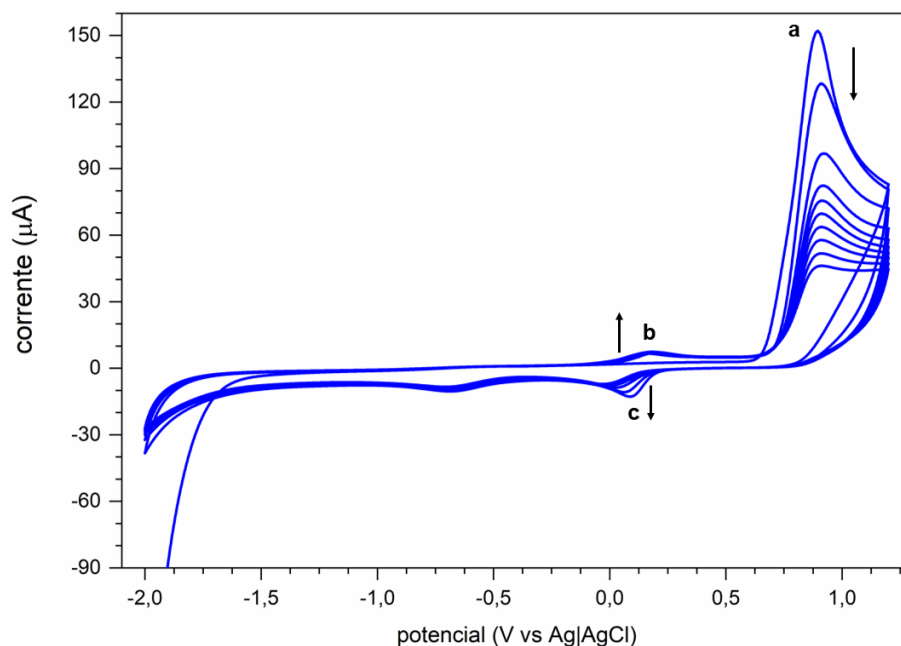


Figura 46 – Voltametria cíclica realizada para promover a eletropolimerização de *p*-ABA na superfície do GCE. (a) pico de oxidação do monômero, (b) E_{PA} do polímero, (c) E_{PC} do polímero

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

A Figura 47 mostra a voltametria cíclica realizada para promover a eletropolimerização de uma solução de PBS contendo 6 mmol L⁻¹ de *p*-ABA e 1 mmol L⁻¹ de HMF (*template*) na superfície do GCE modificado. Próximo ao pico de oxidação do monômero (pico a), é possível observar a formação de um ombro, +0,75 V no primeiro ciclo voltamétrico, que corresponde a adsorção do monômero neutro na superfície do eletrodo. Durante os ciclos seguintes, houve uma mudança no processo de oxidação irreversível para potenciais mais positivos, de +0,90 V (pico a). Esse ombro também pode ser resultado da formação de diferentes radicais livres. A ocorrência de dois picos irreversíveis para a oxidação do monômero sugerem a formação de radicais altamente reativos carregados positivamente. A oxidação observada em +0,75 V indica a iniciação da eletropolimerização do *p*-ABA, enquanto a oxidação observada em +0,90 V indica a continuação da eletropolimerização na superfície do GCE até uma densidade de corrente crítica, onde uma espessura estacionária do polímero é obtida. Nesse ponto, o perfil da CV não é mais afetado pela varredura de potencial pois o produto da reação não é eletroativo na faixa de potencial aplicado (FERREIRA L. *et al.*, 2015). Os valores das correntes do pico a diminuem com o aumento do número de ciclos de polimerização. Esse comportamento é resultado do progressivo consumo do monômero nas vizinhanças

da superfície do eletrodo onde ocorre a eletropolimerização. Esse produto deve cobrir uma fração da superfície do eletrodo, que se torna eletroquimicamente inativa e resulta em um decréscimo gradual da intensidade da corrente do pico.

Os picos em +0,16 V (pico b) e +0,01 V (pico c) correspondem ao par redox irreversível, E_{PA} e E_{PC} , respectivamente. Nesses picos é observado um aumento da corrente com o aumento do número de ciclos.

Quando a varredura segue de -2,0 V para +1,2 V, um pico de redução bem definido é observado em -1,32 V, depois esse pico tem um deslocamento para um potencial um pouco mais negativo nas varreduras seguintes, para -1,39 V (pico d). Esses picos correspondem a redução do HMF.

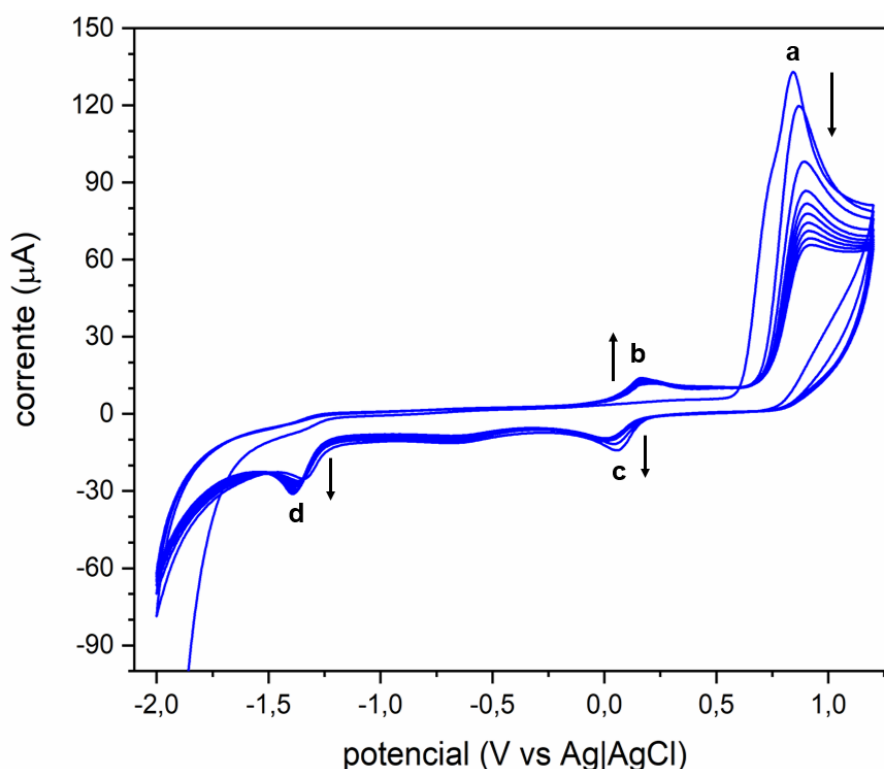


Figura 47 – Voltametria cíclica realizada para promover a eletropolimerização de *p*-ABA na superfície do GCE. (a) pico de oxidação do monômero, (b) E_{PA} do polímero, (c) E_{PC} do polímero, (d) pico de redução do HMF

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

É sugerido que a resposta eletroquímica do HMF é baseada na redução do grupo aldeído ou da ligação dupla do anel, mas que no grupo aldeído ela ocorre com mais facilidade e, dessa forma, deve haver um sinal específico na zona de redução quando há a formação do composto 2,5-di-(hidroximetil)furano (BMFH) (Figura 48) (REYES-SALAS *et al.*, 2006).

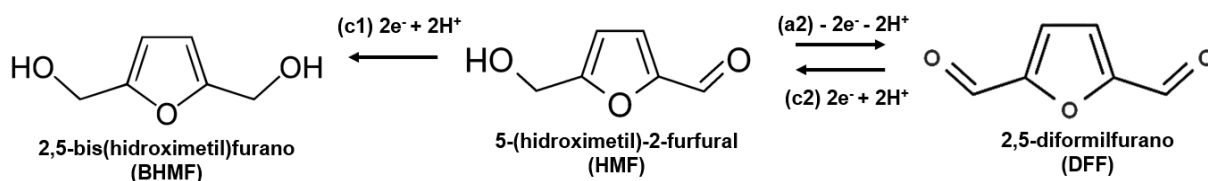


Figura 48 – Oxidação e redução de HMF em meio ácido

Fonte: Adaptada de Salhi, Samet e Trabelsi (2020).

A voltametria cíclica também foi utilizada para investigar as modificações na superfície do eletrodo durante cada etapa do desenvolvimento do MIP, incluindo a remoção do *template* e a religação do analito ao MIP, representada na Figura 49. A cinética de transporte de íons na interface de polímero *p*-ABA com a solução foi estudado pela CV registrada em solução aquosa contendo a sonda redox (2,5 mmol L⁻¹ de K₄Fe(CN)₆, 2,5 mmol L⁻¹ de K₃Fe(CN)₆ em 0,5 mol L⁻¹ de KCl). A natureza da interação do polímero de *p*-ABA com a sonda redox fornece importantes informações sobre as reações de transferência de carga que podem ocorrer na superfície do eletrodo (FERREIRA L. *et al.*, 2015).

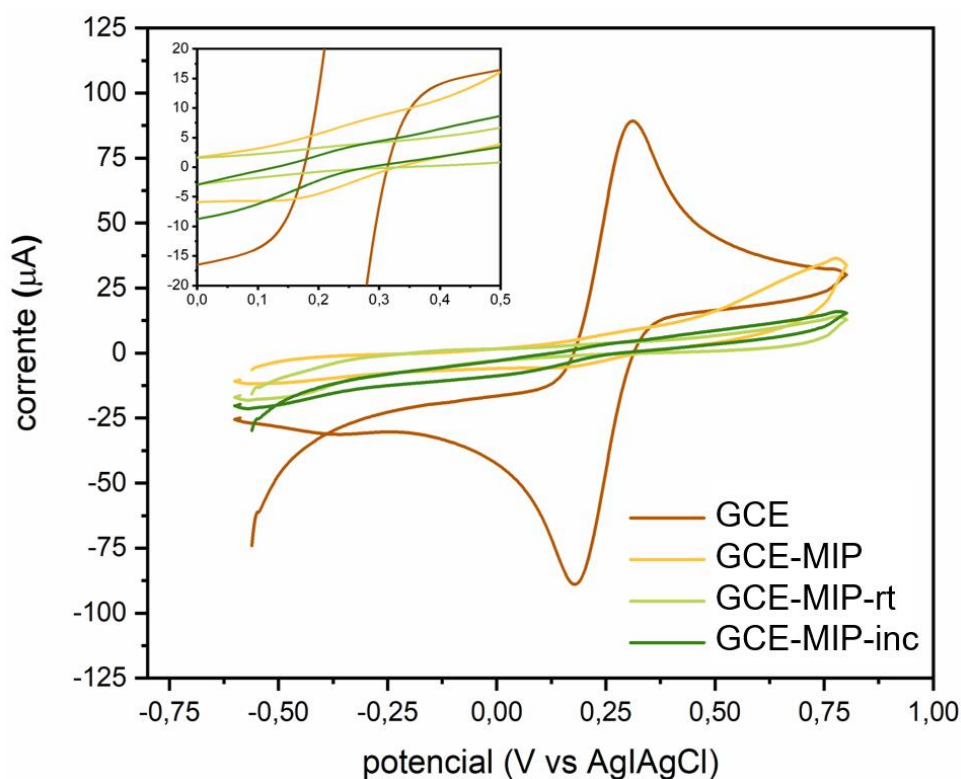


Figura 49 – Voltamogramas obtidos pela análise em sonda redox. GCE: após limpeza do eletrodo com H₂SO₄, GCE-MIP: após eletropolimerização, GCE-MIP-rt: após remoção do template, GCE-MIP-inc: após incubação do MIP em solução padrão de HMF

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

O GCE limpo e não modificado exibe um típico par de picos no voltamograma registrado, que corresponde à oxidação ($E_{ox} = +0,31$ V vs Ag|AgCl) e à redução ($E_{red} = +0,18$ V vs Ag|AgCl) do par redox ferri/ferro (linha marrom – GCE). A subsequente etapa de eletropolimerização é caracterizada por uma queda significativa da corrente de pico no voltamograma correspondente (linha amarela – GCE-MIP), de 97,4 μ A para 0,998 μ A. É sugerido que, durante a etapa de eletropolimerização, uma camada homogênea do polímero de *p*-ABA com as moléculas do *template* (HMF) fortemente ligadas, é formada na superfície do eletrodo finamente polida e eletroquimicamente limpa e, portanto, a transferência de carga envolvida na sonda redox é afetada pela formação do polímero. Na etapa seguinte, a remoção do *template* é obtida pela eluição do HMF em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ sob agitação constante por 3 minutos, essa etapa é caracterizada por uma diminuição adicional da corrente de pico na CV (linha verde claro – GCE-MIP-rt) de 0,998 μ A para 0,162 μ A. Por último, o voltamograma após incubação do MIP em solução de 100 μ mol L⁻¹ de HMF (linha verde escura – GCE-MIP-inc) exibe uma corrente de pico maior do que a observada na etapa anterior, que aumentou de 0,162 μ A para 0,458 μ A. Esse valor está entre os valores de corrente de pico obtidos após eletropolimerização (GCE-MIP) e após a remoção da molécula molde (GCE-MIP-rt). Esses resultados sugerem que a estrutura polimérica com cavidades moleculares vazias é altamente resistiva e que a adição de HMF induz um aumento das correntes de pico.

6.5.2 Otimização dos parâmetros para preparação do MIP

Para o desenvolvimento e otimização das condições para eletropolimerização do MIP, foram avaliados os efeitos de alguns parâmetros na performance do eletrodo, incluindo a concentração de *template* (HMF) e monômero (*p*-ABA), número de ciclos de eletropolimerização, velocidade de varredura e tempo de incubação necessário para a reconexão do HMF nas cavidades específicas do polímero formado. As medições foram realizadas através de análises por DPV de soluções de 100 μ mol L⁻¹ de HMF.

A relação *template*:monômero: é um parâmetro essencial no processo de eletropolimerização pois influencia a estabilidade e seletividade da molécula alvo pelo MIP. Para investigar a melhor proporção para as soluções de polimerização,

foram utilizadas concentrações de *p*-ABA que variaram de 3 a 8 mmol L⁻¹, enquanto a concentração de HMF foi mantida em 1 mmol L⁻¹ (Figura 50). Um aumento na concentração do monômero pode causar uma rápida polimerização e aumento da sensibilidade do sensor. Entretanto, concentrações muito elevadas do monômero podem levar a geração de filmes volumosos e impedir o acesso a alguns dos sítios de reconhecimento (LIU *et al.*, 2011). O melhor desempenho analítico foi obtido para o sensor preparado com 1 e 6 mmol L⁻¹ de HMF e *p*-ABA, respectivamente, representando uma relação de *template*:monômero de 1:6, que foi utilizada para a otimização dos demais parâmetros.

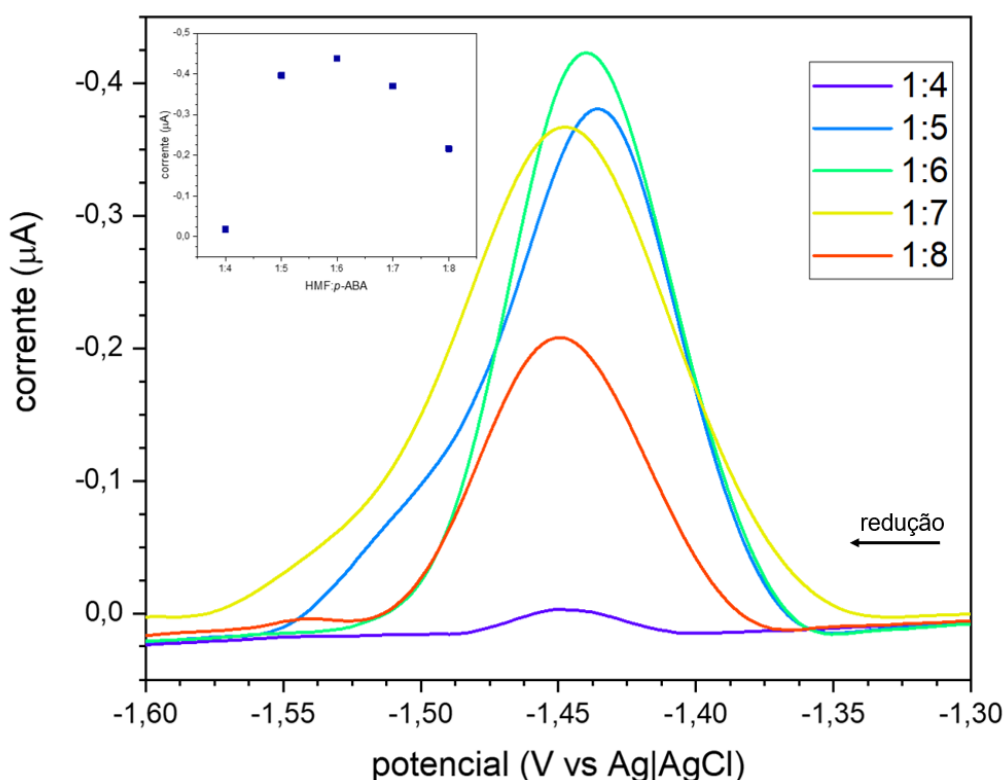


Figura 50 – DPV registrado de -1,3 V a -1,6 V para diferentes proporções entre as concentrações em mmol L⁻¹ entre *template*:monômero (HMF:*p*-ABA)

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

O número e tamanho das cavidades do polímero podem ser afetados pela espessura do filme polimérico, que está relacionado ao número dos ciclos voltamétricos. Ao variar o número de ciclos voltamétricos, a espessura do filme depositado na superfície do GCE pode ser controlada, esse parâmetro afeta a seletividade e sensibilidade do método. No geral, filmes de espessura mais fina possuem mais cavidades impressas, porém essas cavidades podem ficar muito

distantes da superfície do eletrodo e tornar difícil o acesso do analito ao filme polimérico (ROHANI; MOHADESI; ANSARI, 2019).

O número de ciclos voltamétricos é um parâmetro que influencia significativamente os valores da corrente de pico do HMF. Foram realizadas eletropolimerizações utilizando 10, 20, 30, 40 e 50 ciclos voltamétricos para otimização desse parâmetro (Figura 51). Eletropolimerizações realizadas com 10 ciclos mostraram ser a melhor opção, uma vez que maiores quantidades de ciclos não apresentaram uma diferença significativa no valor do sinal e implicariam em aumento do tempo de eletropolimerização. Além disso, quanto maior o número de ciclos de polimerização mais espessa é a camada de filme formada e, portanto, mais difícil é extrair as moléculas de *template* do polímero para formar as cavidades específicas necessárias no MIP. No entanto, se a camada for muito fina, ela pode ser bastante instável e incapaz de polimerizar adequadamente em torno das moléculas do modelo (ROHANI; MOHADESI; ANSARI, 2019).

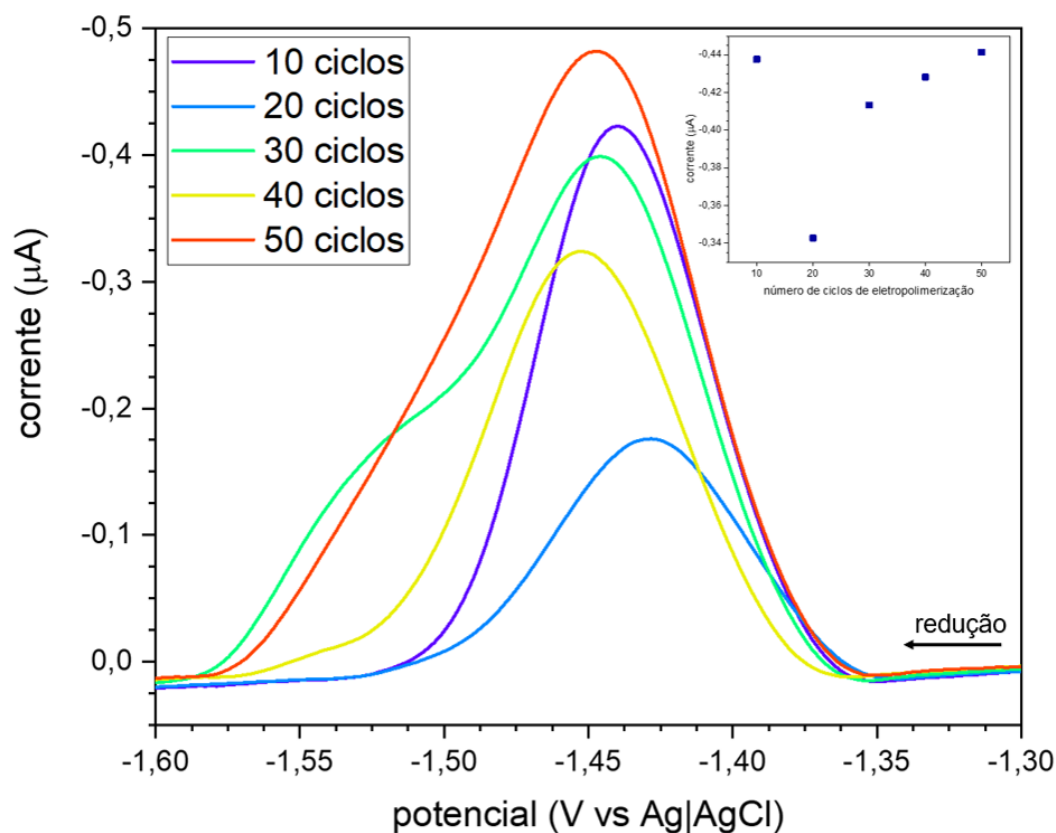


Figura 51 – DPV registrado de -1,3 V a -1,6 V para MIP desenvolvido com diferentes números de ciclos voltamétricos

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

A espessura do filme do MIP (h) foi estimada em 311 ± 2 nm através da resolução da seguinte equação (GROTHER *et al.*, 2010; MATHIEU-SCHEERS *et al.*, 2019):

$$h = \frac{qM}{\rho AnF} \quad (12)$$

onde q é a carga associada com a polimerização, obtida pela integração dos picos durante a eletropolimerização, M é a massa molecular do p -ABA ($137,14 \text{ g mol}^{-1}$), ρ é a densidade do polímero (valor de $1,5 \text{ g cm}^{-3}$ foi adotado), A é a área geométrica do eletrodo ($7,05 \times 10^{-2}$), n é o número de elétrons envolvidos na eletropolimerização de cada molécula de p -ABA (1), e F é a constante de Faraday ($96\,485 \text{ C mol}^{-1}$) (COUTO *et al.*, 2019; GONÇALVES, 2021). A espessura do filme do NIP também foi calculada através dessa equação e foi estimada em 240 ± 13 nm.

Com o objetivo de otimizar a velocidade de varredura, foram avaliadas as velocidades de 10, 25, 50, 75 e 100 mV s^{-1} (Figura 52). A corrente de pico apresentou um aumento de 0 para 50 mV s^{-1} e um decréscimo quando potenciais mais altos foram aplicados, de forma que 50 mV s^{-1} foi adotada como a velocidade de varredura para a eletropolimerização do MIP nas análises posteriores.

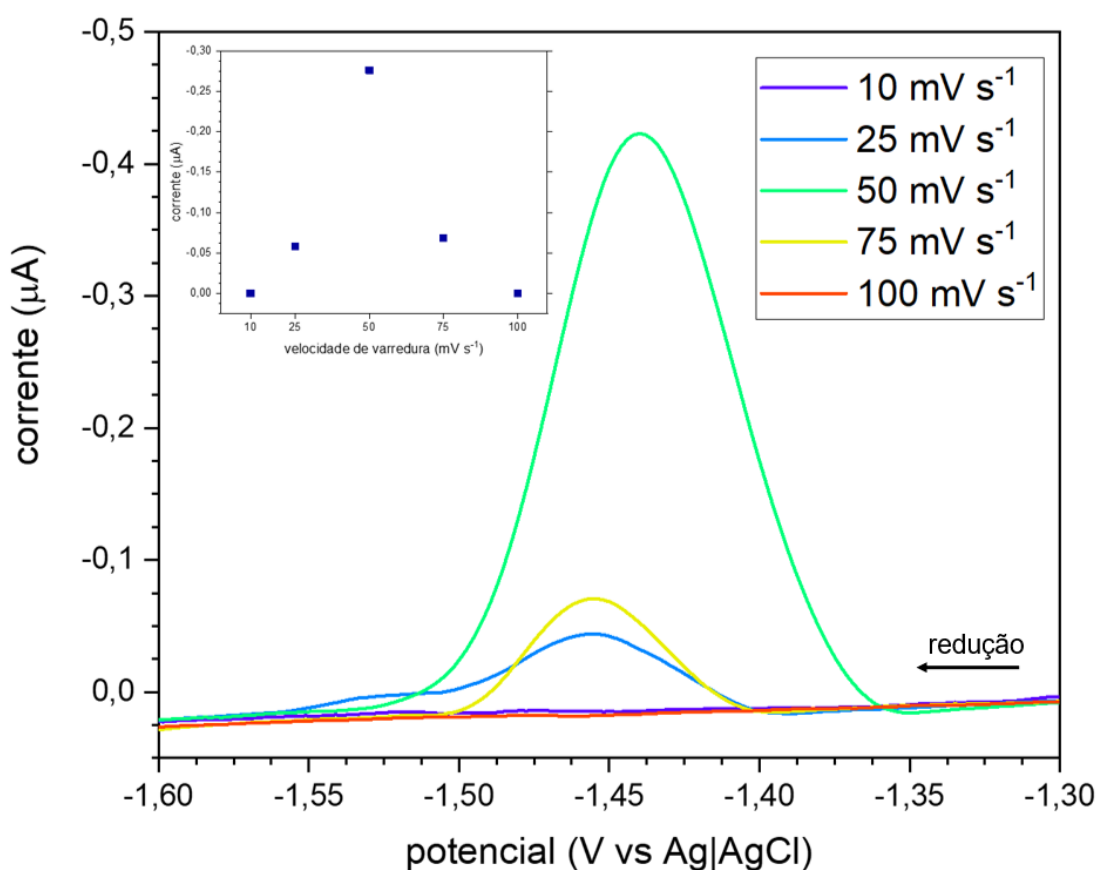


Figura 52 – DPV registrado de -1,3 V a -1,6 V para MIP desenvolvido com diferentes velocidades de varredura

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

O tempo ideal para que o eletrodo permaneça imerso na solução de incubação e permita a religação do analito ao MIP foi avaliado realizando a incubação durante 10, 30, 45, 60 e 75 minutos em solução de HMF de concentração de 100 μmol L⁻¹ (Figura 53). A sensibilidade do sinal do HMF obtido pela DPV apresentou um crescimento com o aumento do tempo de incubação, atingindo um máximo em 45 minutos, após esse período foi observado uma diminuição no sinal quando tempos de incubação maiores foram utilizados.

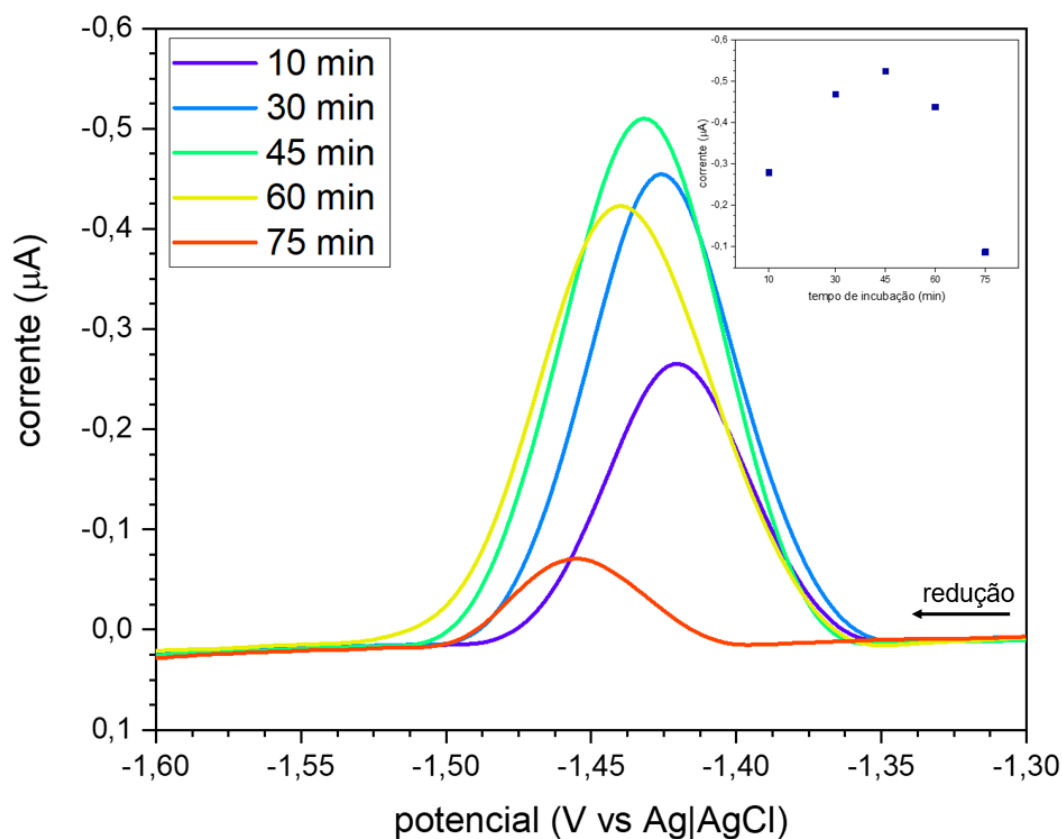


Figura 53 – DPV registrado de -1,3 V a -1,6 V para MIP analisado após diferentes tempos de incubação

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

6.5.3 Otimização da técnica de SALLE

A eficiência da técnica de *salting-out assisted liquid-liquid extraction* (SALLE) foi investigada através das recuperações para o procedimento de extração, realizado com diferentes proporções de ACN e PBS e com diferentes quantidades de NaCl e Na₂CO₃.

Entre os dois eletrólitos avaliados para promover o efeito *salting-out*, Na₂CO₃ mostrou grande variação nos resultados de recuperação, esse comportamento pode ser consequência de uma alteração no pH da solução promovida por este sal (Figura 54).

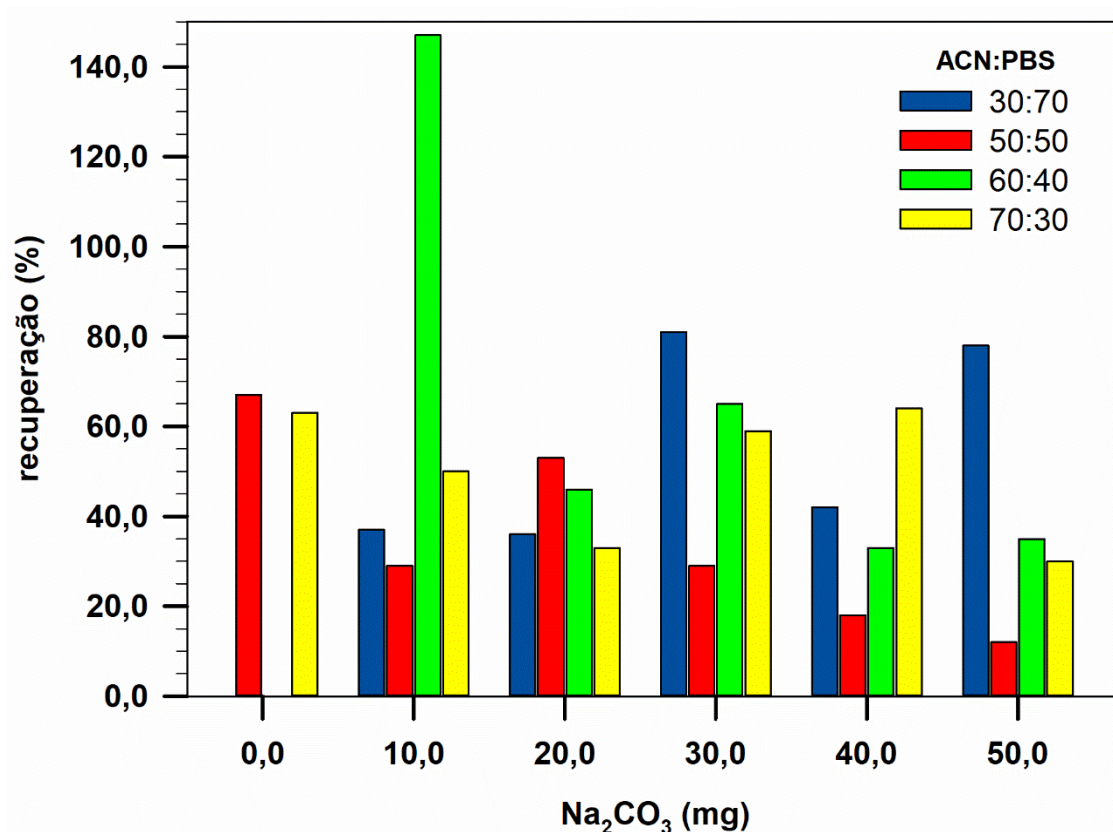


Figura 54 – Recuperações (%) obtidas utilizando diferentes massas de Na₂CO₃ como eletrólito para SALLE e diferentes composições de volume dos solventes (ACN:PBS)

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Recuperações observadas para extrações realizadas com NaCl mostraram ser este um eletrólito mais conveniente para a realização do procedimento de extração do HMF de amostras de café. Adições de 5 mg de NaCl já foram suficientes para promover uma melhoria na extração do HMF, entretanto taxas de recuperação mais satisfatórias foram alcançadas quando quantidades maiores que 10 mg foram adicionadas. As recuperações permaneceram com razões levemente similares mesmo quando quantidades maiores de NaCl foram adicionadas (Figura 55). A proporção entre os volumes de ACN e PBS também apresentou influência para as taxas de recuperação de HMF das amostras. Melhores razões de recuperação foram alcançadas quando maiores volumes de ACN foram empregados, e a proporção de ACN:PBS de 70:30 foi considerada a melhor escolha para as extrações (Figura 55).

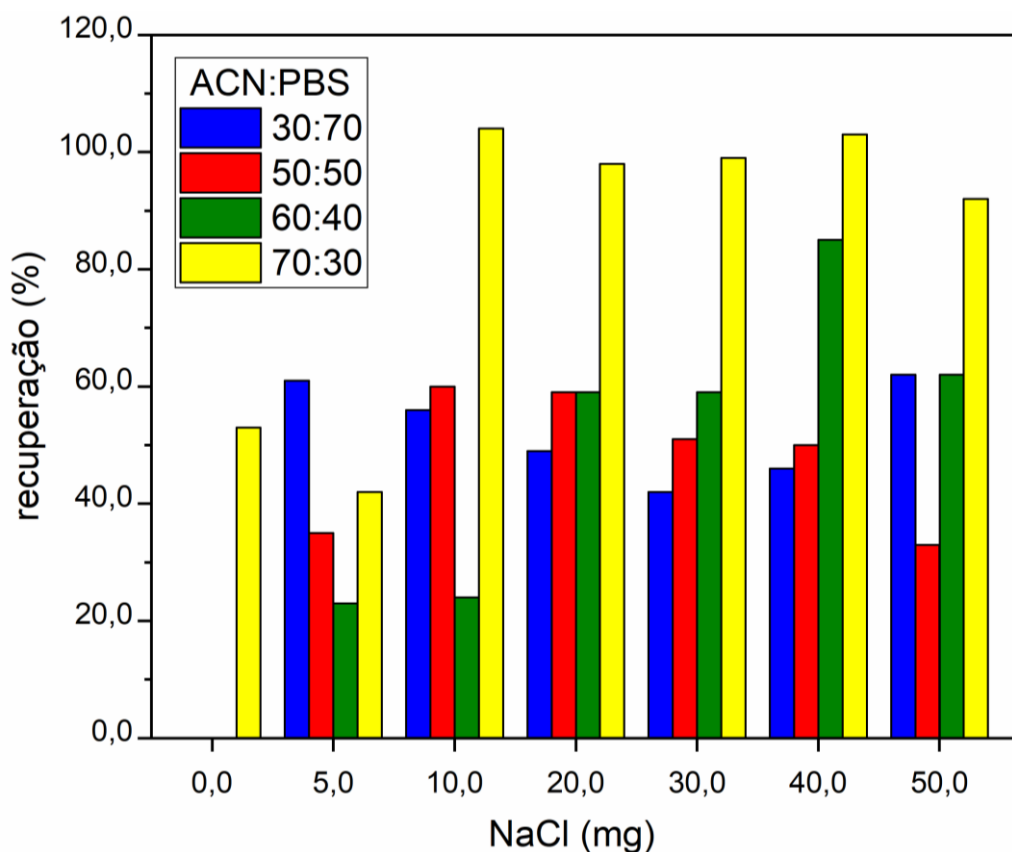


Figura 55 – Recuperações (%) obtidas utilizando diferentes massas de NaCl como eletrólito para SALLE e diferentes composições de volume dos solventes (ACN:PBS)
Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

6.5.4 Avaliação dos parâmetros analíticos do método

Uma forma de avaliar a eficiência do MIP é verificar sua seletividade para moléculas diferentes, porém estruturalmente similares ao analito de interesse ou com possibilidade de serem encontradas no mesmo meio. A seletividade do sensor foi avaliada comparando o sinal obtido pela corrente de pico do HMF ($i = 0,45 \mu\text{A}$ no potencial de $-1,44 \text{ V}$) com o sinal de algumas moléculas importantes pela frequência com que aparecem em alimentos. Foram avaliados como possíveis interferentes: cafeína, glicose, ácido ascórbico, metilglioxal e 2-furfural, todos em concentração de 7 mg L^{-1} . A estrutura das moléculas avaliadas está representada na Figura 56.

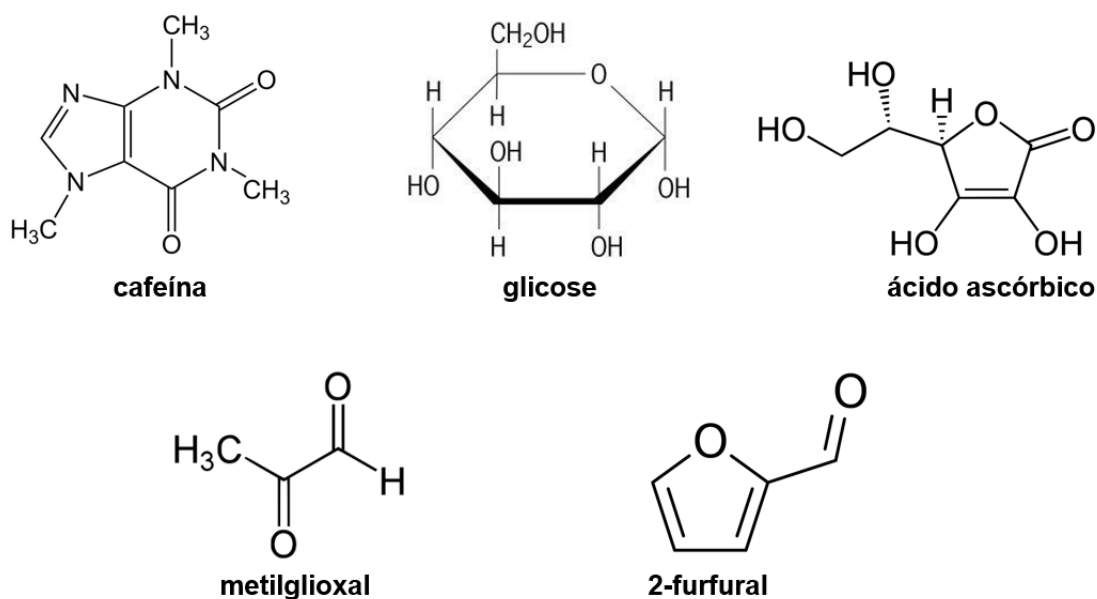


Figura 56 – Moléculas avaliadas como possíveis interferentes na análise de HMF pelo MIP

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Entre as moléculas analisadas, a única que apresentou um sinal dentro do potencial avaliado foi 2-furfural, com um valor de corrente de pico de 0,28 μA determinada no potencial de -1,53 V (Figura 57). Como as duas moléculas foram determinadas em potenciais diferentes e o 2-furfural apresentou menor sensibilidade em comparação ao sinal obtido pelo HMF, o MIP foi, portanto, considerado adequado para a determinação de HMF.

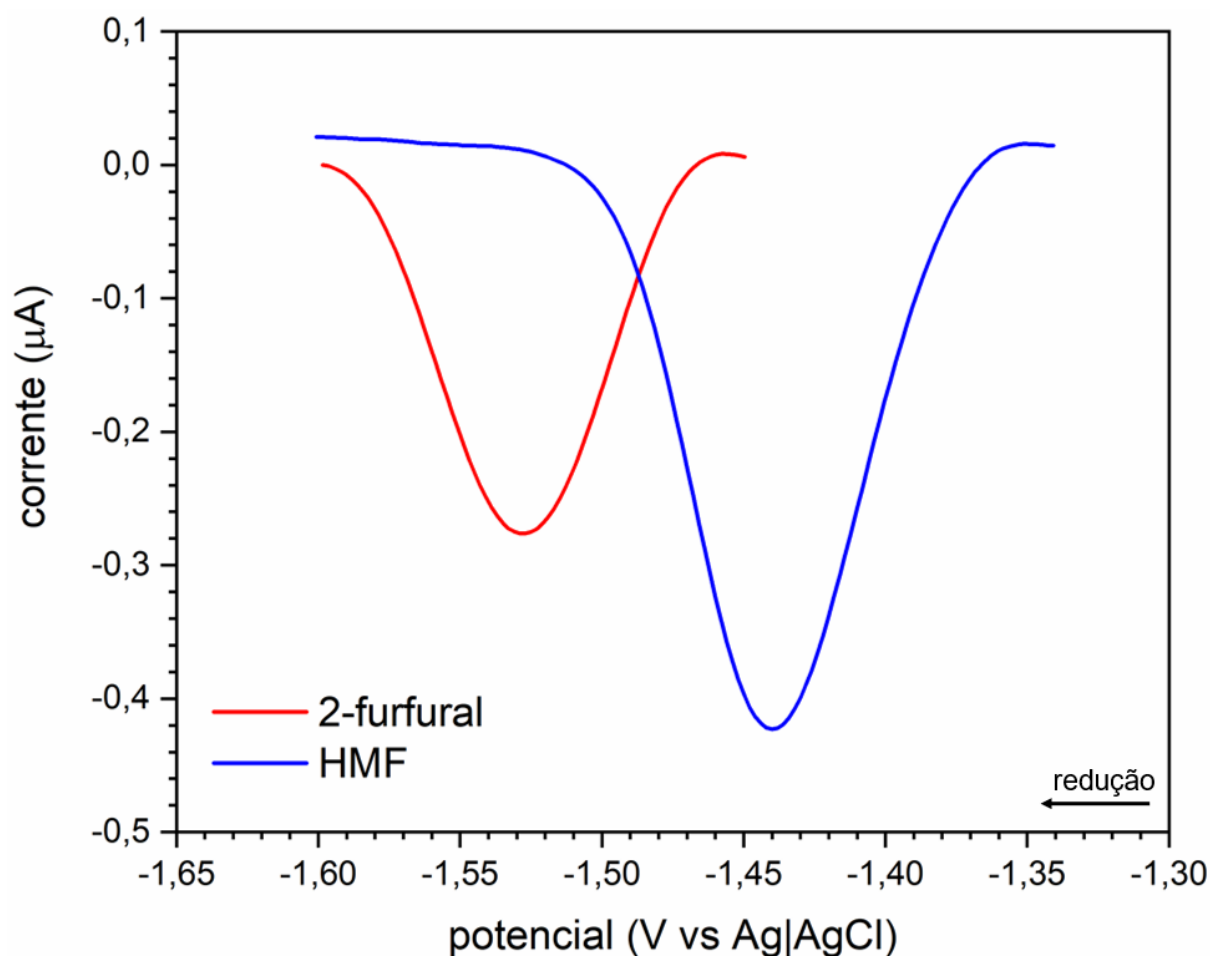


Figura 57 – Comparação entre os voltamogramas obtidos para a análise de 2-furfural e HMF pelo MIP proposto
Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Para avaliar a linearidade do método proposto, foi construída uma curva de calibração com os valores da corrente de pico obtidos no sinal de redução de diferentes concentrações de HMF por DPV. Como mostrado na Figura 58, a resposta da corrente de pico da DPV aumenta conforme aumentam as concentrações de HMF. A equação da regressão linear obtida foi de $8,21 \times 10^{-8} \pm 1,37 \times 10^{-9} [\text{HMF}] - 4,54 \times 10^{-8} \pm 3,16 \times 10^{-9}$ e o coeficiente de determinação (r^2) foi igual a 0,9986. Os limites de detecção e quantificação foram de $0,372 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,240 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, que correspondem a 155 e 517 mg kg^{-1} .

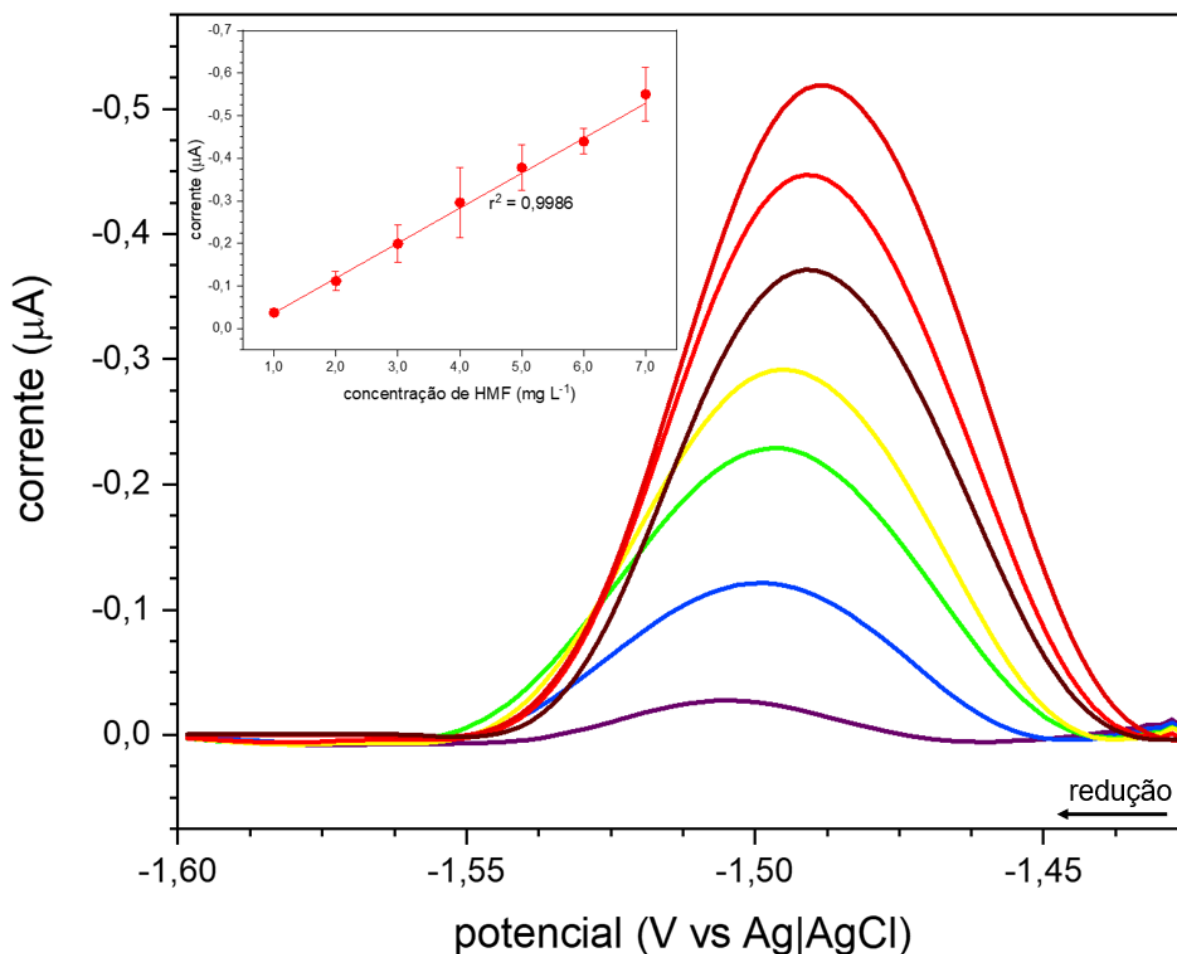


Figura 58 – DPV registrado de -1,3 V a -1,6 V para diferentes concentrações de HMF determinadas pelo MIP proposto e curva de calibração construída com os valores de corrente dessas concentrações

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Um NIP foi preparado de forma análoga ao MIP, porém sem utilizar o *template* (HMF). Após a eletropolimerização e o procedimento de limpeza do MIP, o eletrodo do NIP foi imerso em solução de incubação de HMF nas mesmas concentrações utilizadas para a elaboração da curva de calibração do MIP. A curva de calibração para o NIP forneceu uma equação linear de $3,23 \times 10^{-8} \pm 1,35 \times 10^{-9}$ [HMF] – $3,18 \times 10^{-8} \pm 6,03 \times 10^{-9}$ e um coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9914 (Figura 59). A inclinação da curva de calibração obtida para o MIP demonstra uma sensibilidade maior do que para o NIP, esse resultado assegura que o MIP é mais eficiente que o NIP para reincorporar o analito na superfície do eletrodo.

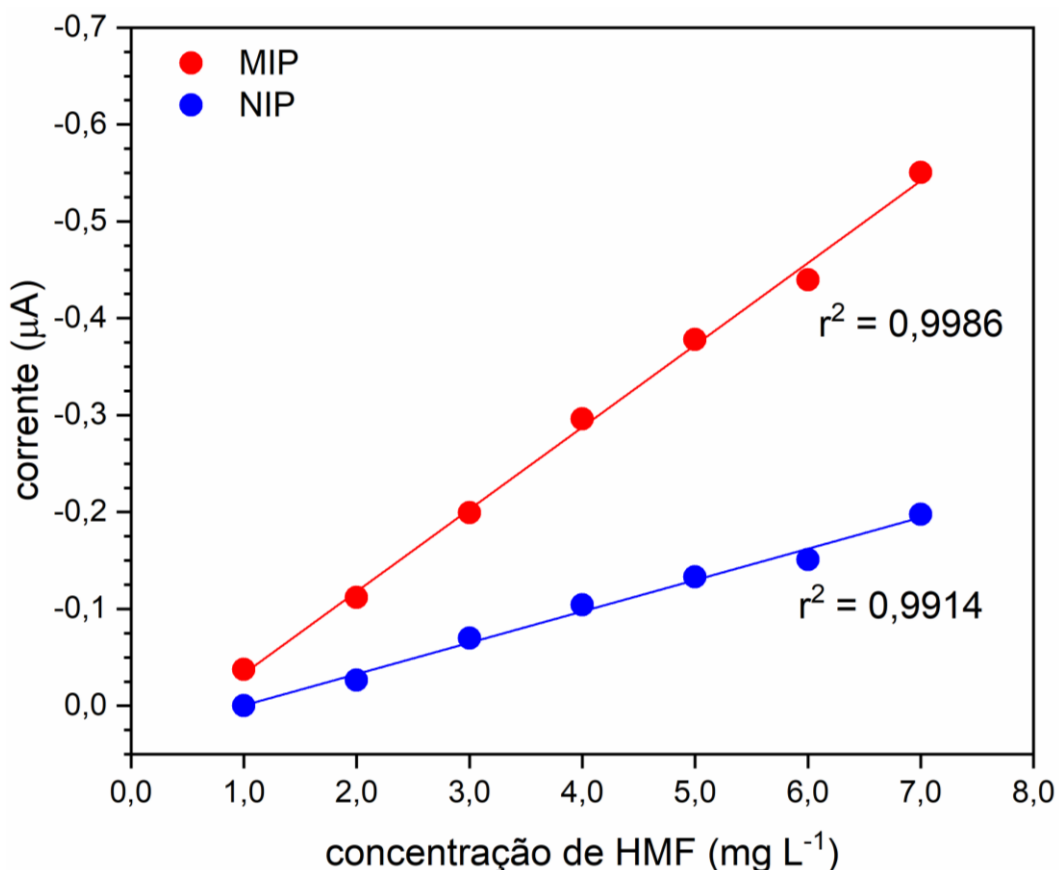


Figura 59 – Comparação das curvas de calibração obtidas para a determinação de HMF pelo MIP e pelo NIP

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Foi calculado o fator de impressão (FI) usando a equação abaixo, onde i_p é a corrente do pico (NDUNDA, 2020).

$$FI = \frac{i_p (MIP)}{i_p (NIP)} \quad (13)$$

FI deve ser maior do que 1 e possuir o maior valor possível. O FI calculado para as concentrações de HMF utilizadas apresentou valores entre 2,79 e 4,22, demonstrando que o MIP oferece condições adequadas para a medição eletroquímica de HMF.

O efeito matriz foi avaliado pela curva construída com adição de padrões de HMF às amostras de café, que forneceu uma equação de reta de $6,12 \times 10^{-8} \pm 1,39 \times 10^{-9}$ [HMF] – $3,38 \times 10^{-8} \pm 5,56 \times 10^{-9}$, e um r^2 de 0,9974. A Figura 60 representa a curva de calibração e a curva com adição de padrão. As inclinações das duas curvas foram comparadas pelo teste t de *Student* com intervalo de confiança de 95 %.

Como houve uma diferença significativa ($t < 0,05$) entre as inclinações dos dois modelos de calibração, adotou-se o método da curva com adição de padrão para quantificação do HMF.

Os resultados mostram que a matriz tem um efeito pronunciado nas análises. Houve uma diminuição na sensibilidade do método na análise por DPV quando os experimentos foram realizados na presença da matriz de café. A matriz, possivelmente, dificulta a extração dos analitos e fornece um menor enriquecimento da fase orgânica em comparação com as soluções de padrões extraídas por SALLE. Diniz *et al.* (2020) também reportaram um efeito da matriz significativamente negativo na análise por DPV para determinação de ronidazol em carne bovina. O efeito negativo da matriz observado em algumas análises voltamétricas, em muitos casos, é considerado como um fator limitante para essas análises. Algumas matrizes, de fato, inviabilizam a análise por voltametria, entretanto, efeitos negativos da matriz também são observados em análises realizadas por outros métodos analíticos, e essa acaba por ainda ser uma desvantagem encontrada ao se trabalhar com matrizes de elevada complexidade. Ao invés de ser considerado como uma limitação, essa dificuldade deve ser encarada como um desafio analítico e ser trabalhada com o propósito de encontrar soluções que mais benefícios e melhorias possam causar às análises.

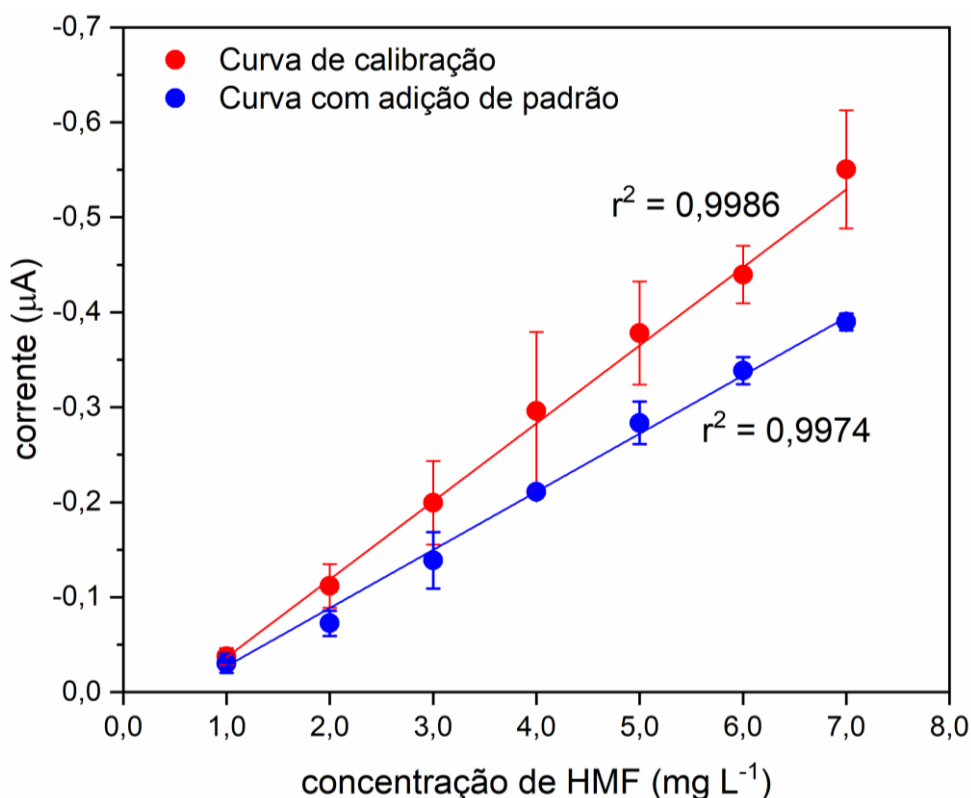


Figura 60 – Comparação entre as curvas de calibração e curva com adição de padrão para o HMF

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

A repetibilidade do método foi avaliada pela análise no mesmo dia de 6 réplicas de amostras com adição de solução padrão nas concentrações de 4 mg L⁻¹ e 7 mg L⁻¹ de HMF nas soluções de incubação. A reprodutibilidade foi avaliada pela análise em 6 dias diferentes de amostras de HMF em solução nas mesmas concentrações que a repetibilidade. Para ambas as concentrações a repetibilidade obtida foi de 6 % e a reprodutibilidade foi de 10 %. Foram determinadas taxas de recuperação de 97 % para concentração de 1 mg L⁻¹, de 99 % para concentração de 4 mg L⁻¹ e de 101 % para concentração de 7 mg L⁻¹.

Os parâmetros analíticos avaliados mostraram que o método proposto é adequado para análise de HMF em amostras de café e pode ser uma alternativa para métodos analíticos previamente descritas na literatura (Quadro 4). As principais vantagens do método de utilizando SALLE e MIP são a simplicidade do procedimento experimental, a fácil operação, boas seletividade e sensibilidade. Além disso, o método é ambientalmente amigável, uma vez que utiliza poucas quantidades de solventes orgânicos.

6.5.5 Determinação de HMF em amostras de café

O método proposto de extração por SALLE e análise por MIP foi utilizado para determinação de HMF em amostras de diferentes marcas de café em pó e instantâneo. As concentrações de HMF encontradas nas amostras analisadas estão descritas na Tabela 8. As concentrações de HMF determinadas ficaram entre 261,0 (41,0) mg kg⁻¹ e 770,0 (55,9) mg kg⁻¹ para amostras de café em pó e entre 1510 (50) mg kg⁻¹ e 4445 (278) mg kg⁻¹ para amostras de café instantâneo. Possivelmente o processo de produção do café instantâneo favorece o aumento da concentração de HMF no produto final. Além disso, o café instantâneo é um produto totalmente solúvel em água, enquanto no café em pó uma massa não solúvel permanece ao final do preparo, isso também pode influenciar resultados maiores de HMF no café instantâneo.

Tabela 8 – Concentração de HMF nas amostras de café determinadas pelo método proposto

Amostra	Modo de Preparo	Característica	HMF (mg kg ⁻¹)
A	em pó	tradicional	723,1 (47,3)
B	em pó	tradicional	580,8 (94,2)
C	em pó	tradicional	261,0 (41,0)
D	em pó (cápsula)	tradicional	770,2 (55,9)
E	em pó (cápsula)	tradicional	378,0 (72,1)
F	instantâneo	forte	4445 (278)
G	instantâneo	forte (líoilizado)	2227 (219)
H	instantâneo	descafeinado	1920 (95)
I	instantâneo	tradicional	1510 (50)
J	instantâneo	clássico	1943 (30)

Fonte: Elaborada pela Autora (2021).

Cheong *et al.* (2013) encontraram concentrações de 3 a 27 mg L⁻¹ de HMF em amostras de café arábica. Albouchi e Murkovic (2019) encontraram concentrações de 28,5 mg L⁻¹ de HMF em amostras de café de infusão de filtro e de 29 mg L⁻¹ em café expresso. Arribas-Lorenzo e Morales (2010) determinaram concentrações de HMF de 110 mg kg⁻¹ em amostra de café em pó e de 2480 mg kg⁻¹ em café instantâneo. Ciaramelli, Palmioli e Aioldi (2019) encontraram concentrações de HMF em café entre 1,18 e 3,70 mg kg⁻¹. Concentração de HMF variaram de 262 à 547 mg kg⁻¹ em café em pó e de 91 à 3060 mg kg⁻¹ em café instantâneo (HUSØY *et al.*, 2008). Murkovic e Bornik (2006) encontraram concentrações de HMF em café que

variaram de 300 à 1900 mg kg⁻¹ e Macheiner *et al.* (2021) encontraram concentrações entre 77,7 e 322 mg kg⁻¹. Concentrações de HMF em sementes de café variaram de 233 mg kg⁻¹ em torrefação à 240 °C por 8 minutos à 449 mg kg⁻¹ em torrefação à 220 °C por 10 minutos (HAMZALIOĞLU; GÖKMEN, 2020). Concentração de HMF em café turco tradicional foi determinada na faixa de 213-239 mg kg⁻¹ e de 336-362 mg kg⁻¹ em café turco instantâneo (MORTAS *et al.*, 2017).

6.6 Conclusões

O método de extração utilizando SALLE e MIP desenvolvido mostrou ser adequado para detecção e quantificação de HMF em amostras de café. A combinação de MIP com técnicas adicionais de separação não é incomum devido à complexidade de algumas amostras, especialmente amostras alimentares. Os parâmetros experimentais do SALLE e do sensor MIP foram otimizados e o método apresentou seletividade adequada e bons parâmetros analíticos. O MIP mostrou ter sensibilidade para identificação e quantificação do HMF. A adição de NaCl e extração com ACN proporcionaram melhores recuperações para o HMF da amostra, demonstrando a eficiência da técnica SALLE para a extração desse analito. A verificação dos parâmetros analíticos apresentou resultados que validam a aplicação do método para análises em amostras de café. Análises em amostras de café mostraram que o HMF alcançou concentrações de 261,0 (41,0) a 770,2 (55,9) mg kg⁻¹ em amostras de café em pó e de 1510 (50) a 4445 (278) mg kg⁻¹ em amostras de café instantâneo.

O método proposto apresenta vantagens em relação a outros métodos já apresentados na literatura devido à sua simplicidade, fácil operação, baixo custo e utilização de volumes pequenos de solventes orgânicos.

7 CONCLUSÕES GERAIS

Quando se fala em qualidade alimentar diferentes características do alimento podem ser consideradas para se chegar a um critério de qualidade. A qualidade está relacionada, principalmente, à saúde e segurança do consumidor, mas também a forma como este avalia aquele produto. O interesse pelo controle de qualidade impulsiona o surgimento de novas técnicas analíticas capazes de identificar compostos que forneçam informações a respeito de determinados aspectos do alimento.

A composição de aminas biogênicas em amostras de peixes e carnes podem fornecer informações a respeito do grau de degradação e das condições de higiene que esses alimentos foram submetidos. A composição de HMF em amostras de café fornece indicações a respeito dos processamentos que foram empregados na sua produção. A presença de aldeídos na composição volátil de amostras de café pode fornecer sensações organolépticas positivas à bebida, entretanto a ingestão de quantidades elevadas de aldeídos pode provocar efeitos adversos à saúde. Por isso o interesse em buscar métodos analíticos para determinação desses compostos em alimentos.

O preparo de amostras é uma etapa crucial nas análises de alimentos, e técnicas simples, rápidas e ambientalmente amigáveis para determinação de analitos nessas matrizes tem ganhado cada vez mais destaque. Neste contexto, a extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE) é uma técnica que fornece alta eficiência de separação e alta taxas de recuperação dos analitos de interesse, além de ser fácil de executar e ter um baixo custo. Ao longo do desenvolvimento do trabalho foi demonstrado que a extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE) é uma técnica que pode ser adaptada a diversas matrizes e analitos com propriedades químicas e físicas diferentes. Compostos não voláteis podem ser separados aproveitando as diferentes solubilidades que apresentam para diferentes polaridades de solventes. Já compostos voláteis podem ser separados da matriz fazendo com que passem para a fase vapor e posteriormente sejam recolhidos em uma solução contendo um reagente específico para o analito. Finalmente, a determinação analítica é escolhida pelo analista baseado no problema levantado.

Nesse trabalho, SALLE mostrou ser uma técnica de preparo de amostra adequada para extração de aminas de alimentos de origem animal e de aldeídos de

amostras de café. O emprego de SALLE forneceu alta taxas de enriquecimento dos analitos nas alíquotas analisadas e permitiu que a reação de derivatização, quando necessária, e a etapa de extração fossem realizadas simultaneamente, diminuindo as etapas de tratamento das amostras.

Um MIP foi desenvolvido para fornecer maior seletividade às extrações de HMF de amostras de café em associação com SALLE. As condições de eletropolimerização para formação do MIP foram otimizadas para permitir a melhor sensibilidade para o método.

Todos os procedimentos propostos foram validados e apresentaram bons parâmetros analíticos, confirmando que os métodos são adequados para identificação e quantificação de aminas e aldeídos nas amostras estudadas.

O método de extração proposto foi associado a diferentes técnicas analíticas (cromatografia, eletroanalítica e espectrofotometria) e utilizado para extração em diferentes tipos de amostras. Demonstrando que a SALLE pode contribuir para o desenvolvimento de métodos que forneçam informações a respeito de alimentos que se deseja analisar ou de compostos específicos presentes nessas matrizes.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, K.; ANDRES, S.; PALAVINSKAS, R.; BERG, K.; APPEL, K. E.; LAMPEN, A. Toxicology and risk assessment of acrolein in food. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. 9, p. 1277-1290, 2011. DOI 10.1002/mnfr.201100481.
- ABU-BAKAR, N. B.; MAKAHLEH, A.; SAAD, B. Vortex-assisted liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of furfurals and patulin in fruit juices. **Talanta**, v. 120, p. 47-54, 2014. DOI 10.1016/j.talanta.2013.11.081.
- AHMAD, O. S.; BEDWELL, T. S.; ESEN, C.; GARCIA-CRUZ, A.; PILETSKY, S. A. Molecularly imprinted polymers in electrochemical and optical sensors. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 294-309, 2019. DOI 10.1016/j.tibtech.2018.08.009.
- AHMED, O. S.; LADNER, Y.; MONTELS, J.; PHILIBERT, L.; PERRIN, C. Coupling of salting-out assisted liquid-liquid extraction with on-line stacking for the analysis of tyrosine kinase inhibitors in human plasma by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1579, p. 121-128, 2018. DOI 10.1016/j.chroma.2018.10.017.
- AHMED, O. S.; LADNER, Y.; XIA, J.; MONTELS, J.; PHILIBERT, L.; PERRIN, C. A fully automated on-line salting-out assisted liquid-liquid extraction capillary electrophoresis methodology: application to tyrosine kinase inhibitors in human plasma. **Talanta**, v. 208, p. 120391, 2020. DOI 10.1016/j.talanta.2019.120391.
- AKPINAR, K.; KARAKAŞ, B.; AKÇA, H.; CERTEL, M. Determination of HMF in roasted flour/oil mixtures and effect of solvent used in the extraction procedure. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 790-794, 2011. DOI 10.1016/j.foodchem.2011.03.060.
- AKRAMIPOUR, R.; FATTAHI, N.; PIRSAHEB, M.; GHEINI, S. Combination of counter current salting-out homogenous liquid-liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction as a novel microextraction of drugs in urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1012, p. 162-168, 2016. DOI 10.1016/j.jchromb.2016.01.031.
- AL BULUSHI, I.; POOLE, S.; DEETH, H. C.; DYKES, G. A. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation - a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 4, p. 369-377, 2009.
- ALBOUCHI, A.; MURKOVIC, M. LC method for the direct and simultaneous determination of four major furan derivatives in coffee grounds and brews. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 9, p. 1695-1701, 2019. DOI 10.1002/jssc.201900061.
- ALMEIDA, J. M. F. de; SILVA, E. M. F.; VERÍSSIMO, L. M.; FERNANDES, N. S. Salting-out assisted liquid-liquid extraction method combined with GC-MS for the determination of topiramate in aqueous solutions: development and application of the methodology. **Separation Science and Technology**, v. 55, n. 13, p. 2303-2312, 2020. DOI 10.1080/01496395.2019.1624570.
- ALSHISHANI, A. A.; SAAD, B.; SEMAIL, N. F.; MOHAMAD SALHIMI, S.; TALIB, M. K. M. Salting-out assisted liquid-liquid extraction method coupled to gas chromatography for the simultaneous determination of thujones and pulegone in beverages. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 3, p. S2776-S2785, 2018. DOI 10.1080/10942912.2017.1373665.

ALSHISHANI, A.; SALHIMI, S. M.; SAAD, B. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled with hydrophilic interaction chromatography for the determination of biguanides in biological and environmental samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1073, p. 51-59, 2018. DOI 10.1016/j.jchromb.2017.12.013.

ALVAREZ, M. A.; MORENO-ARRIBAS, M. V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39, n. 2, p. 146-155, 2014. DOI 10.1016/j.tifs.2014.07.007.

ANAM, O. O.; DART, R. K. Influence of metal ions on hydroxymethylfurfural formation in honey. **Analytical Proceedings Including Analytical Communications**, v. 32, n. 12, p. 515-517, 1995. DOI 10.1039/A19953200515.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANDRADE, J. K. de; KOMATSU, E.; PERREAULT, H.; TORRES, Y. R.; DA ROSA, M. R.; FELSNER, M. L. In house validation from direct determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Brazilian corn and cane syrups samples by HPLC-UV. **Food Chemistry**, v. 190, p. 481-486, 2016. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.05.131.

ANESE, M.; BOT, F.; SUMAN, M. Furan and 5-hydroxymethylfurfural removal from high- and low-moisture foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 529-532, 2014. DOI 10.1016/j.lwt.2013.12.030.

ANESE, M.; SUMAN, M. Mitigation strategies of furan and 5-hydroxymethylfurfural in food. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 257-264, 2013. DOI 10.1016/j.foodres.2012.12.024.

AOAC. CHEMISTS. 31.111: by means of refratometer. *In*: HORWITZ, W. (ed.). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 13th ed. Washington, DC: AOAC, 1980. p. 251.

ARIAS-PÉREZ, I.; SÁENZ-NAVAJAS, M. P.; DE-LA-FUENTE-BLANCO, A.; FERREIRA, V.; ESCUDERO, A. Insights on the role of acetaldehyde and other aldehydes in the odour and tactile nasal perception of red wine. **Food Chemistry**, v. 361, p. 130081, 2021. DOI 10.1016/j.foodchem.2021.130081.

ARRIBAS-LORENZO, G.; MORALES, F. J. Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 644-649, 2010. DOI 10.1016/j.fct.2009.11.046.

BAÑOS, C. E.; SILVA, M. In situ continuous derivatization/pre-concentration of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine in aqueous samples by solid-phase extraction: application to liquid chromatography determination of aldehydes. **Talanta**, v. 77, n. 5, p. 1597-1602, 2009. DOI 10.1016/j.talanta.2008.09.053.

BASHEER, C.; PAVAGADHI, S.; YU, H.; BALASUBRAMANIAN, R.; LEE, H. K. Determination of aldehydes in rainwater using micro-solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 41, p. 6366-6372, 2010. DOI 10.1016/j.chroma.2010.08.012.

BENKERROUM, N. Biogenic amines in dairy products: origin, incidence, and control means. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 801-826, 2016. DOI 10.1111/1541-4337.12212.

BERTI, R. C.; SANTOS, D. C. Importância do controle de qualidade na indústria alimentícia: prováveis medidas para evitar contaminação por resíduos de limpeza em bebida UHT. **Atas de Ciências da Saúde**, v. 4, n. 1, p. 23-38, 2016.

BERTUZZI, T.; MULAZZI, A.; RASTELLI, S.; DONADINI, G.; ROSSI, F.; SPIGNO, G. Targeted healthy compounds in small and large-scale brewed beers. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125935, 2020. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.125935.

BILGIN, B.; GENÇCELEP, H. Determination of biogenic amines in fish products. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 1907-1913, 2015.

BILUCA, F. C.; DELLA BETTA, F.; DE OLIVEIRA, G. P.; PEREIRA, L. M.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 159, p. 244-249, 2014. DOI 10.1016/j.foodchem.2014.03.016.

BRANDÃO, P. F.; RAMOS, R. M.; VALENTE, I. M.; ALMEIDA, P. J.; CARRO, A. M.; LORENZO, R. A.; RODRIGUES, J. A. Gas-diffusion microextraction coupled with spectrophotometry for the determination of formaldehyde in cork agglomerates. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 11, p. 2885-2892, 2017. DOI 10.1007/s00216-017-0233-x.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**: guia para validação de métodos analíticos e bionalíticos. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html. Acesso em: 24 abr. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas hídrica e alimentar no Brasil**: informe 2022. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/arquivos/doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-dtha/apresentacao-surtos-dtha-2022.pdf/view>. Acesso em: 8 fev. 2022.

BRESSAN, L. P.; DO NASCIMENTO, P. C.; SCHMIDT, M. E. P.; FACCIN, H.; DE MACHADO, L. C.; BOHRER, D. Salting-out assisted liquid-liquid extraction and partial least squares regression to assay low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons leached from soils and sediments. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 749-756, 2017. DOI 10.1016/j.saa.2016.10.036.

CÂMARA, J. S.; ALVES, M. A.; MARQUES, J. C. Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, n. 1/2, p. 188-197, 2006. DOI 10.1016/j.aca.2005.10.031.

CENNAMO, N.; ZENI, L.; PESAVENTO, M.; MARCHETTI, S.; MARLETTA, V.; BAGLIO, S.; GRAZIANI, S.; PISTORIO, A.; ANDÒ, B. A novel sensing methodology to detect furfural in water, exploiting MIPs, and inkjet-printed optical waveguides. **IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement**, v. 68, n. 5, p. 1582-1589, 2019. DOI 10.1109/TIM.2018.2879170.

CHAICHI, M.; GHASEMZADEH-MOHAMMADI, V.; HASHEMI, M.; MOHAMMADI, A. Furanic compounds and furfural in different coffee products by headspace liquid-phase micro-extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry: survey and effect of brewing procedures. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2015. DOI 10.1080/19393210.2014.981601.

CHAICHI, M.; MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M. Optimization and application of headspace liquid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for determination of furanic compounds in coffee using response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 108, p. 46-52, 2013. DOI 10.1016/j.microc.2012.12.009.

CHEN, W.; TU, X.; WU, D.; GAO, Z.; WU, S.; HUANG, S. Comparison of the partition efficiencies of multiple phenolic compounds contained in propolis in different modes of acetonitrile-water-based homogenous liquid-liquid extraction. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 1-11, 2019a. DOI 10.3390/molecules24030442.

CHEN, W.; WU, S.; ZHANG, J.; YU, F.; MIAO, X.; TU, X. Salting-out-assisted liquid-liquid extraction of 5-hydroxymethylfurfural from honey and the determination of 5-hydroxymethylfurfural by high-performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 11, n. 37, p. 4835-4841, 2019b. DOI 10.1039/c9ay01770d.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1/2, p. 191-219, 2008. DOI 10.1016/j.chroma.2007.10.026.

CHEONG, M. W.; TONG, K. H.; ONG, J. J. M.; LIU, S. Q.; CURRAN, P.; YU, B. Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 388-396, 2013. DOI 10.1016/j.foodres.2012.12.058.

CHERNETSOVA, E. S.; MORLOCK, G. E. Assessing the capabilities of direct analysis in real time mass spectrometry for 5-hydroxymethylfurfural quantitation in honey. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 314, p. 22-32, 2012. DOI 10.1016/j.ijms.2012.01.012.

CHONG, C. Y.; ABU BAKAR, F.; RAHMAN, R. A.; BAKAR, J.; ZAMAN, M. Z. Biogenic amines, amino acids and microflora changes in Indian mackerel (*Rastrellinger kanagurta*) stored at ambient (25-29 °C) and ice temperature (0 °C). **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 6, p. 1118-1125, 2014.

CHOUDHARY, A.; KUMAR, V.; KUMAR, S.; MAJID, I.; AGGARWAL, P.; SURI, S. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) formation, occurrence and potential health concerns: recent developments. **Toxin Reviews**, p. 1-18, 2020. DOI 10.1080/15569543.2020.1756857.

CIARAMELLI, C.; PALMIOLI, A.; AIROLDI, C. Coffee variety, origin and extraction procedure: Implications for coffee beneficial effects on human health. **Food Chemistry**, v. 278, p. 47-55, 2019. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.11.063.

COCO, F. L.; VALENTINI, C.; NOVELLI, V.; CECCON, L. Liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in beer. **Analytica Chimica Acta**, v. 306, p. 57-64, 1995.

CORDEIRO, L.; VALENTE, I. M.; SANTOS, J. R.; RODRIGUES, J. A. Qualitative carbonyl profile in coffee beans through GDME-HPLC-DAD-MS/MS for coffee preliminary characterization. **Food Research International**, v. 107, p. 536-543, 2018. DOI 10.1016/j.foodres.2018.02.072.

COUTO, R. A. S.; COSTA, S. S.; MOUNSSEF, B.; PACHECO, J. G.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; RODRIGUES, C. M. P.; DELERUE-MATOS, C.; BRAGA, A. A. C.; MOREIRA GONÇALVES, L.; QUINAZ, M. B. Electrochemical sensing of ecstasy with electropolymerized molecularly imprinted poly(o-phenylenediamine) polymer on the surface of disposable screen-printed carbon electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 290, p. 378-386, 2019. DOI 10.1016/j.snb.2019.03.138.

CUI, B.; LIU, P.; LIU, X.; LIU, S.; ZHANG, Z. Molecularly imprinted polymers for electrochemical detection and analysis: progress and perspectives. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 9, n. 6, p. 12568-12584, 2020. DOI 10.1016/j.jmrt.2020.08.052.

CUKROWSKA, E.; CHIMUKA, L.; NSENGIMANA, H.; KWARAMBA, V. Application of supported liquid membrane probe for extraction and preconcentration of organotin compounds from environmental water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, n. 1, p. 141-147, 2004. DOI 10.1016/j.aca.2004.07.021.

CUSTODIO-MENDOZA, J. A.; AJA-MACAYA, J.; VALENTE, I. M.; RODRIGUES, J. A.; ALMEIDA, P. J.; LORENZO, R. A.; CARRO, A. M. Determination of malondialdehyde, acrolein and four other products of lipid peroxidation in edible oils by Gas-Diffusion Microextraction combined with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1627, p. 461397, 2020. DOI 10.1016/j.chroma.2020.461397.

CUSTODIO-MENDOZA, J. A.; VALENTE, I. M.; RAMOS, R. M.; LORENZO, R. A.; CARRO, A. M.; RODRIGUES, J. A. Analysis of free malondialdehyde in edible oils using gas-diffusion microextraction. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 82, p. 103254, 2019. DOI 10.1016/j.jfca.2019.103254.

CUSTÓDIO, F. B.; THEODORO, K. H.; GLORIA, M. B. A. Bioactive amines in fresh beef liver and influence of refrigerated storage and pan-roasting. **Food Control**, v. 60, p. 151-157, 2016. DOI 10.1016/j.foodcont.2015.07.037.

DAPKEVICIUS, M. L. N. E.; NOUT, M. J. R.; ROMBOUTS, F. M.; HOUBEN, J. H.; WYMENGA, W. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, n. 1/2, p. 107-114, 2000. DOI 10.1016/S0168-1605(00)00238-5.

DELVALLE, J.; YAMADA, T. Amino acids and amines stimulate gastrin release from canine antral G-cells via different pathways. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 1, p. 1398-143, 1990.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005. DOI 10.1016/j.numecd.2005.05.003.

DINIZ, J. A.; OKUMURA, D. L.; ALEIXO, H.; GURGEL, AL.; SILVA, A. F. S. A voltammetric screening method to determine ronidazole in bovine meat. **Journal of Environmental Science and Health: Part B**, v. 55, n. 6, p. 583-591, 2020.

DOEUN, D.; DAVAATSEREN, M.; CHUNG, M. S. Biogenic amines in foods. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1463-1474, 2017. DOI 10.1007/s10068-017-0239-3.

DOUNY, C.; TIHGIÖN, A.; BAYONNET, P.; BROSE, F.; DEGAND, G.; ROZET, E.; MILET, J.; RIBONNET, L.; LAMBIN, L.; LARONDELLE, Y.; SCIPPO, M. L. Validation of the analytical procedure for the determination of malondialdehyde and three other aldehydes in vegetable oil using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and application to linseed oil. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 6, p. 1425-1435, 2015. DOI 10.1007/s12161-014-0028-z.

DRABIK-MARKIEWICZ, G.; DEJAEGHER, B.; DE MEY, E.; KOWALSKA, T.; PAELINCK, H.; VANDER HEYDEN, Y. Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of N-nitrosamine in heated cured pork meat. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1539-1545, 2011.

EFSA. Endogenous formaldehyde turnover in humans compared with exogenous contribution from food sources. **EFSA Journal**, v. 12, n. 2, p. 1-11, 2014. DOI 10.2903/j.efsa.2014.3550.

EFSA. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on request from the commission related to flavouring group evaluation 13; furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain substituents and heteroatoms from chemical group 14 (Commission Regulation (EC) No 1565/2000 of 18 July 2000. **EFSA Journal**, v. 3, n. 7, p. 1-13, 2005. DOI 10.2903/j.efsa.2005.215

EFSA. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **EFSA Journal**, v. 9, n. 10, 2011. DOI 10.2903/j.efsa.2011.2393.

ELIAS, R. J.; LAURIE, V. F.; EBELER, S. E.; WONG, J. W.; WATERHOUSE, A. L. Analysis of selected carbonyl oxidation products in wine by liquid chromatography with diode array detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, n. 1, p. 104-110, 2008. DOI 10.1016/j.aca.2008.07.048.

EMBRAPA. **Produção mundial de café robusta deve atingir 77,1 milhões de sacas de 60 kg na safra 2021-2022 e quebrar recorde histórico**. Brasília: Embrapa, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/65533440/producao-mundial-de-cafe-robusta-deve-atingir-771-milhoes-de-sacas-de-60kg-na-safra-2021-2022-e-quebrar-recorde-historico>. Acesso em: 15 jan. 2022.

ER DEMIRHAN, B.; DEMIRHAN, B.; SÖNMEZ, C.; TORUL, H.; TAMER, U.; YENTÜR, G. Determination of potential 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde and 2-furaldehyde compounds in follow-on milks and infant formulas using the high-performance liquid chromatography method. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 818-822, 2015. DOI 10.3168/jds.2014-8761.

ERIM, F. B. Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. **TrAC: Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 239-247, 2013. DOI 10.1016/j.trac.2013.05.018

FAYER, G. C. Jr. **Soybean use**: companion animals. Iowa: Soybean Meal Information Center, 2004. 4 p. Fact sheet.

FALLICO, B.; ZAPPALÀ, M.; ARENA, E.; VERZERA, A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 305-313, 2004. DOI 10.1016/j.foodchem.2003.07.010.

FAN, H.; LIU, X.; HONG, H.; SHEN, S.; XU, Q.; FENG, L.; LUO, Y. Quality changes and biogenic amines accumulation of black carp (*Mylopharyngodon piceus*) fillets stored at different temperatures. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 4, p. 635-645, 2016. DOI 10.4315/0362-028X.JFP-15-373.

FAN, Y.; HU, S.; LIU, S. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled to dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of chlorophenols in wine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 24, p. 3662-3668, 2014. DOI 10.1002/jssc.201400869.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M.; BIN-JUMAH, M.; OTHMAN, S. I.; KHAFAGA, A. F.; SHAHEEN, H. M.; SAMAK, D.; SHEHATA, A. M.; ALLAM, A. A.; ABD EL-HACK, M. E. The toxicological aspects of the heat-borne toxicant 5-hydroxymethylfurfural in animals: a review. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1-13, 2020. DOI 10.3390/molecules25081941.

FARAJZADEH, M. A.; FERIDUNI, B.; AFSHAR MOGADDAM, M. R. Development of counter current salting-out homogenous liquid-liquid extraction for isolation and preconcentration of some pesticides from aqueous samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 885, p. 122-131, 2015. DOI 10.1016/j.aca.2015.05.031.

FEDDERN, V.; MAZZUCO, H.; FONSECA, F. N.; LIMA, G. J. M. M. de. A review on biogenic amines in food and feed: toxicological aspects, impact on health and control measures. **Animal Production Science**, v. 59, n. 4, p. 608-618, 2019. DOI 10.1071/AN18076.

FENG, C.; TEUBER, S.; GERSHWIN, M. E. Histamine (scombroid) fish poisoning: a comprehensive review. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 50, n. 1, p. 64-69, 2016.

FERREIRA, L. F.; SANTOS, C. C.; DA CRUZ, F. S.; CORREA, R. A. M. S.; VERLY, R. M.; SILVA, L. M. da. Preparation, characterization, and application in biosensors of functionalized platforms with poly(4-aminobenzoic acid). **Journal of Materials Science**, v. 50, n. 3, p. 1103-1116, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8667-4>

FERREIRA, R. C.; RAMOS, R. M.; GONÇALVES, L. M.; ALMEIDA, P. J.; RODRIGUES, J. A. Application of gas-diffusion microextraction to solid samples using the chromatographic determination of α -diketones in bread as a case study. **Analyst**, v. 140, n. 10, p. 3648-3653, 2015. DOI 10.1039/c5an00196j.

FIKAROVÁ, K.; HORSTKOTTE, B.; MACHIÁN, D.; SKLENÁŘOVÁ, H.; SOLICH, P. Lab-in-syringe for automated double-stage sample preparation by coupling salting out liquid-liquid extraction with online solid-phase extraction and liquid chromatographic separation for sulfonamide antibiotics from urine. **Talanta**, v. 221, p. 121427, 2021. DOI 10.1016/j.talanta.2020.121427.

FOGUEL, M. V. **Detecção e quantificação de corantes de importância ambiental empregando sensores químicos baseados em fibras ópticas e polímeros molecularmente impressos**. Orientador: Maria Del Pilar Taboada Sotomayor. 2015. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

FOLADOR, J. F.; KARR-LILIENTHAL, L. K.; PARSONS, C. M.; BAUER, L. L.; UTTERBACK, P. L.; SCHASTEEN, C. S.; BECHTEL, P. J.; FAHEY, G. C. Fish meals, fish components, and fish protein hydrolysates as potential ingredients in pet foods. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 10, p. 2752-2765, 2006. DOI 10.2527/jas.2005-560.

FRANCISCO, K. C. A.; BRANDÃO, P. F.; RAMOS, R. M.; GONÇALVES, L. M.; CARDOSO, A. A.; RODRIGUES, J. A. Salting-out assisted liquid-liquid extraction with dansyl chloride for the determination of biogenic amines in food. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 1, p. 248-258, 2020. DOI 10.1111/ijfs.14300.

FRANCO, M. O. K.; SUAREZ, W. T.; DOS SANTOS, V. B. Digital Image method smartphone-based for furfural determination in sugarcane spirits. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 2, p. 508-515, 2017. DOI 10.1007/s12161-016-0605-4.

FRAQUEZA, M. J.; ALFAIA, C. M.; BARRETO, A. S. Biogenic amine formation in turkey meat under modified atmosphere packaging with extended shelf life: index of freshness. **Poultry Science**, v. 91, n. 6, p. 1465-1472, 2012. DOI 10.3382/ps.2011-01577.

FU, C.; LI, Z.; SUN, Z.; XIE, S. A review of salting-out effect and sugaring-out effect: driving forces for novel liquid-liquid extraction of biofuels and biochemicals. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 15, n. 4, p. 854-871, 2021. DOI 10.1007/s11705-020-1980-3.

FU, H.; SUN, Y.; TENG, H.; ZHANG, D.; XIU, Z. Salting-out extraction of carboxylic acids. **Separation and Purification Technology**, v. 139, p. 36-42, 2015. DOI 10.1016/j.seppur.2014.11.001.

GALGANO, F.; FAVATI, F.; BONADIO, M.; LORUSSO, V.; ROMANO, P. Role of biogenic amines as index of freshness in beef meat packed with different biopolymeric materials. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1147-1152, 2009.

GARCÍA-VILLANOVA, B.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, E.; MONTILLA, J. Liquid chromatography for the determination of 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde in breakfast cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1254-1255, 1993. DOI 10.1021/jf00032a017.

GEZAHEGN, T.; TEGEGNE, B.; ZEWE, F.; CHANDRAVANSI, B. S. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for the determination of ciprofloxacin residues in water samples by high performance liquid chromatography-diode array detector. **BMC Chemistry**, v. 13, n. 28, p. 1-10, 2019. DOI 10.1186/s13065-019-0543-5.

GIBSON, G. L. E. Y. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonie microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines. In: HUI, Y. H. (ed.). **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. Boca Raton: CRC Press, 2005. v. 4, chap. 13, p. 1-38.

GOGGIN, M. M.; JANIS, G. C. Salt-assisted liquid-liquid extraction of meconium for analysis of cocaine and amphetamines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods in Molecular Biology**, v. 1872, p. 199-209, 2019. DOI 10.1007/978-1-4939-8823-5_19.

GÖKMEN, V.; KOCADAĞLI, T.; GÖNCÜOĞLU, N.; MOGOL, B. A. Model studies on the role of 5-hydroxymethyl-2-furfural in acrylamide formation from asparagine. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 168-174, 2012. DOI 10.1016/j.foodchem.2011.10.048.

GOMES, S.; DIAS, L. G.; MOREIRA, L. L.; RODRIGUES, P.; ESTEVINHO, L. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 544-548, 2010. DOI 10.1016/j.fct.2009.11.029.

GONÇALVES, L. M. Electropolymerized molecularly imprinted polymers: perceptions based on recent literature for soon-to-be world-class scientists. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 25, p. 100640, 2021. DOI 10.1016/j.coelec.2020.09.007.

GONÇALVES, L. M.; MAGALHÃES, P. J.; VALENTE, I. M.; PACHECO, J. G.; DOSTÁLEK, P.; SÝKORA, D.; RODRIGUES, J. A.; BARROS, A. A. Analysis of aldehydes in beer by gas-diffusion microextraction: characterization by high-performance liquid chromatography-diode-array detection-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 24, p. 3717-3722, 2010. DOI 10.1016/j.chroma.2010.04.002.

GRIFFITH, C. J. Food safety: where from and where to?. **British Food Journal**, v. 108, n. 1, p. 6-15, 2006. DOI 10.1108/00070700610637599.

GROTHER, R. A.; LOBATO, A. B.; TASIĆ, N.; BRAGA, A. A. C.; MALDANER, A. O.; ALDOUS, L.; PAIXÃO, T. R. L. C.; GONÇALVES, L. M. Electroanalytical profiling of cocaine samples by means of an electropolymerized molecularly imprinted polymer using benzocaine as the template molecule. **Analyst**, v. 146, n. 5, p. 1747-1759, 2021

GRUNERT, K. G. Food quality and safety: consumer perception and demand. **European Review of Agricultural Economics**, v. 32, n. 3, p. 369-391, 2005. DOI 10.1093/eurrag/jbi011.

GÜLCAN, Ü.; CANDAL USLU, C.; MUTLU, C.; ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAŞ, M. Impact of inert and inhibitor baking atmosphere on HMF and acrylamide formation in bread. **Food Chemistry**, v. 332, p. 127434, 2020. DOI 10.1016/j.foodchem.2020.127434.

GURE, A.; LARA, F. J.; MORENO-GONZÁLEZ, D.; MEGERSA, N.; DEL OLMO-IRUELA, M.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Salting-out assisted liquid-liquid extraction combined with capillary HPLC for the determination of sulfonylurea herbicides in environmental water and banana juice samples. **Talanta**, v. 127, p. 51-58, 2014. DOI 10.1016/j.talanta.2014.03.070.

HAJKOVA, K.; JURASEK, B.; SYKORA, D.; PALENICEK, T.; MIKSATKOVA, P.; KUCHAR, M. Salting-out-assisted liquid-liquid extraction as a suitable approach for determination of methoxetamine in large sets of tissue samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 4, p. 1171-1181, 2016. DOI 10.1007/s00216-015-9221-1.

HAMED, A. M.; ARROYO-MANZANARES, N.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L. Determination of fusarium toxins in functional vegetable milks applying salting-out-assisted liquid-liquid extraction combined with ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 34, n. 11, p. 2033-2041, 2017. DOI 10.1080/19440049.2017.1368722.

HAMZALIOĞLU, A.; GÖKMEN, V. 5-Hydroxymethylfurfural accumulation plays a critical role on acrylamide formation in coffee during roasting as confirmed by multiresponse kinetic modelling. **Food Chemistry**, v. 318, p. 126467, 2020. DOI 10.1016/j.foodchem.2020.126467.

HAN, G.; WEBB, M. R.; WATERHOUSE, A. L. Acetaldehyde reactions during wine bottle storage. **Food Chemistry**, v. 290, p. 208-215, 2019. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.03.137.

HEMMATI, M.; TEJADA-CASADO, C.; LARA, F. J.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; RAJABI, M.; DEL OLMO-IRUELA, M. Monitoring of cyanotoxins in water from hypersaline microalgae colonies by ultra high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometry detection following salting-out liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1608, p. 460409, 2019. DOI 10.1016/j.chroma.2019.460409.

HERNÁNDEZ-JOVER, T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2098-2102, 1997.

HERNÁNDEZ-MESA, M.; CARBONELL-ROZAS, L.; CRUCES-BLANCO, C.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. A high-throughput UHPLC method for the analysis of 5-nitroimidazole residues in milk based on salting-out assisted liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 1068, p. 125-130, 2017. DOI 10.1016/j.jchromb.2017.10.016.

HERNÁNDEZ-MESA, M.; CRUCES-BLANCO, C.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Simple and rapid determination of 5-nitroimidazoles and metabolites in fish roe samples by salting-out assisted liquid-liquid extraction and UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 252, n. 1, p. 294-302, 2018. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.01.101.

HONIKEL, K. O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, v. 78, n. 1/2, p. 68-76, 2008.

HU, Y.; HUANG, Z.; LI, J.; YANG, H. Concentrations of biogenic amines in fish, squid and octopus and their changes during storage. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2604-2611, 2012.

HUANG, K. J.; XU, C. X.; XIE, W. Z.; WANG, W. Electrochemical behavior and voltammetric determination of tryptophan based on 4-aminobenzoic acid polymer film modified glassy carbon electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 74, n. 1, p. 167-171, 2009. DOI 10.1016/j.colsurfb.2009.07.013.

HUSØY, T.; HAUGEN, M.; MURKOVIC, M.; JÖBSTL, D.; STØLEN, L. H.; BJELLAAS, T.; RØNNINGBORG, C.; GLATT, H.; ALEXANDER, J. Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3697-3702, 2008. DOI 10.1016/j.fct.2008.09.048.

IMAZATO, T.; SHIOKAWA, A.; KUROSE, Y.; KATOU, Y.; KISHIKAWA, N.; OHYAMA, K.; ALI, M. F. B.; UEKI, Y.; MAEHATA, E.; KURODA, N. Determination of 4-hydroxy-2-nonenal in serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after pre-column derivatization using 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 6, p. 891-894, 2014. DOI 10.1002/bmc.3204.

JAIN, A.; GUPTA, M.; VERMA, K. K. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for the determination of biogenic amines in fruit juices and alcoholic beverages after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate and high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1422, p. 60-72, 2015. DOI 10.1016/j.chroma.2015.10.036.

JAIN, A.; VERMA, K. K. Strategies in liquid chromatographic methods for the analysis of biogenic amines without and with derivatization. **TrAC: Trends in Analytical Chemistry**, v. 109, p. 62-82, 2018. DOI 10.1016/j.trac.2018.10.001.

JAIN, D.; ATHAWALE, R.; BAJAJ, A.; SHRIKHANDE, S. Double-salting out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) HPLC method for estimation of temozolomide from biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 970, p. 86-94, 2014. DOI 10.1016/j.jchromb.2014.02.031.

JAIRATH, G.; SINGH, P. K.; DABUR, R. S.; RANI, M.; CHAUDHARI, M. Biogenic amines in meat and meat products and its public health significance: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 11, p. 6835-6846, 2015. DOI 10.1007/s13197-015-1860-x.

JEONG, H. S.; CHUNG, H.; SONG, S. H.; KIM, C. II; LEE, J. G.; KIM, Y. S. Validation and determination of the contents of acetaldehyde and formaldehyde in foods. **Toxicological Research**, v. 31, n. 3, p. 273-278, 2015. DOI 10.5487/TR.2015.31.3.273.

JIA, C.; ZHU, X.; WANG, J.; ZHAO, E.; HE, M.; CHEN, L.; YU, P. Combination of dispersive solid-phase extraction and salting-out homogeneous liquid-liquid extraction for the determination of organophosphorus pesticides in cereal grains. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 14, p. 1862-1866, 2014. DOI 10.1002/jssc.201400251.

JÖNSSON, J. Å.; MATHIASSEN, L. Membrane extraction in analytical chemistry. **Journal of Separation Science**, v. 24, n. 7, p. 495-507, 2001. DOI 10.1002/1615-9314(20010801)24:7<495::AID-JSSC495>3.0.CO;2-B.

JUNG, H. J.; KIM, S. H.; YOO, K. C.; LEE, J. H. Changes in acetaldehyde and formaldehyde contents in foods depending on the typical home cooking methods. **Journal of Hazardous Materials**, v. 414, p. 125475, 2021. DOI 10.1016/j.jhazmat.2021.125475.

KAVOUSHI, P.; MIRHOSSEINI, H.; GHAZALI, H.; ARIFFIN, A. A. Formation and reduction of 5-hydroxymethylfurfural at frying temperature in model system as a function of amino acid and sugar composition. **Food Chemistry**, v. 182, p. 164-170, 2015. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.02.135.

KHALIL, M. I.; SULAIMAN, S. A.; GAN, S. H. High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2388-2392, 2010. DOI 10.1016/j.fct.2010.05.076.

KHATIBI, S. A.; HAMIDI, S.; SIAHI-SHADBAD, M. R. Application of liquid-liquid extraction for the determination of antibiotics in the foodstuff: recent trends and developments. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, p. 1-16, 2020. DOI 10.1080/10408347.2020.1798211.

KIM, H. S.; LEE, S. Y.; HUR, S. J. Effects of different starter cultures on the biogenic amine concentrations, mutagenicity, oxidative stress, and neuroprotective activity of fermented sausages and their relationships. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 424-429, 2019.

KISHIKAWA, N.; EL-MAGHRABEY, M. H.; KURODA, N. Chromatographic methods and sample pretreatment techniques for aldehydes determination in biological, food, and environmental samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 175, p. 112782, 2019. DOI 10.1016/j.jpba.2019.112782.

KLAUSEN, N. K.; LUND, E. Formation of biogenic amines in herring and mackerel. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 182, n. 6, p. 459-463, 1986.

KÖSE, S.; KORAL, S.; TUFAN, B.; POMPE, M.; SCAVNIÇAR, A.; KOÇAR, D. Biogenic amine contents of commercially processed traditional fish products originating from European countries and Turkey. **European Food Research and Technology**, v. 235, n. 4, p. 669-683, 2012.

KUMARI, A.; VUPPALA, S.; SATYAVATHI, B. Salting-Out Assisted Liquid-Liquid Extraction (SALLE) for the separation of morpholine from aqueous stream: phase equilibrium, optimization and modeling. **Journal of Molecular Liquids**, v. 298, p. 111884, 2020. DOI 10.1016/j.molliq.2019.111884.

KUOSMANEN, K.; LEHMUSJÄRVI, M.; HYÖTYLÄINEN, T.; JUSSILA, M.; RIEKKOLA, M. L. Factors affecting microporous membrane liquid-liquid extraction. **Journal of Separation Science**, v. 26, n. 9-10, p. 893-902, 2003. DOI 10.1002/jssc.200301481.

LAMARCA, R. S.; LUCHIARI, N. C.; BONJORNO, A. F.; PASSARETTI FILHO, J.; CARDOSO, A. A.; LIMA GOMES, P. C. Determination of formaldehyde in cosmetic products using gas-diffusion microextraction coupled with a smartphone reader. **Analytical Methods**, v. 11, n. 29, p. 3697-3705, 2019. DOI 10.1039/c9ay00720b.

LÁZARO, C. A.; CONTE-JÚNIOR, C. A.; CANTO, A. C.; MONTEIRO, M. L. G.; COSTA-LIMA, B.; CRUZ, A. G. da; MÁRSICO, E. T.; FRANCO, R. M. Biogenic amines as bacterial quality indicators in different poultry meat species. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 15-21, 2015. DOI 10.1016/j.lwt.2014.09.025.

LÁZARO, C. A.; CONTE-JÚNIOR, C. A.; CUNHA, F. L.; MÁRSICO, E. T.; MANO, S. B.; FRANCO, R. M. Validation of an HPLC methodology for the identification and quantification of biogenic amines in chicken meat. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 1024-1032, 2013.

LEE, L. W.; TAY, G. Y.; CHEONG, M. W.; CURRAN, P.; YU, B.; LIU, S. Q. Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowia lipolytica*: II. Roasted coffee. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 32-42, 2017. DOI 10.1016/j.lwt.2017.01.070.

LEE, T. P.; SAKAI, R.; MANAF, N. A.; RODHI, A. M.; SAAD, B. High performance liquid chromatography method for the determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices marketed in Malaysia. **Food Control**, v. 38, n. 1, p. 142-149, 2014. DOI 10.1016/j.foodcont.2013.10.018.

LEGGETT, D. C.; JENKINS, T. F.; MIYARES, P. H. Salting-out solvent extraction for preconcentration of neutral polar organic solutes from water. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 13, p. 1355-1356, 1990. DOI 10.1021/ac00212a029.

LI, T.; ZHANG, L.; TONG, L.; LIAO, Q. High-throughput salting-out-assisted homogeneous liquid-liquid extraction with acetonitrile for determination of baicalin in rat plasma with high-performance liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 5, p. 648-653, 2014. DOI 10.1002/bmc.3083.

LIMA, L. F. de; BRANDÃO, P. F.; DONEGATTI, T. A.; RAMOS, R. M.; GONÇALVES, L. M.; CARDOSO, A. A.; PEREIRA, E. A.; RODRIGUES, J. A. 4-hydrazinobenzoic acid as a derivatizing agent for aldehyde analysis by HPLC-UV and CE-DAD. **Talanta**, v. 187, p. 113-119, 2018. DOI 10.1016/j.talanta.2018.04.091.

LIN, Y. L.; WANG, P. Y.; HSIEH, L. L.; KU, K. H.; YEH, Y. T.; WU, C. H. Determination of linear aliphatic aldehydes in heavy metal containing waters by high-performance liquid chromatography using 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 36, p. 6377-6381, 2009. DOI 10.1016/j.chroma.2009.07.018.

LINEBACK, D. R.; STADLER, R. H. Introduction to food process toxicants. *In*: STADLER, R. H.; LINEBACK, D. R. (ed.). **Process-induced food toxicants**: occurrence, formation, mitigation and health risks. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. Chap. 1, p. 3-20.

LIU, J.; JIANG, M.; LI, G.; XU, L.; XIE, M. Miniaturized salting-out liquid-liquid extraction of sulfonamides from different matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 679, n. 1-2, p. 74-80, 2010. DOI 10.1016/j.aca.2010.09.013.

LIU, Q.; LIU, Y.; CHEN, S.; LIU, Q. Ionic liquid for single-drop microextraction followed by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection to determine carbonyl compounds in environmental waters. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 15, p. 2376-2382, 2010. DOI 10.1002/jssc.201000051.

LIU, X.; LUO, L.; ZHANG, Y.; DING, Y. Electropolymerization of 4-aminobenzoic acid containing nano-Au deposited on carbon paste electrode for determination of acetaminophen. **Journal of the Iranian Chemical Research**, v. 5, n. 3, p. 161-171, 2012.

LIU, Y. T.; DENG, J.; XIAO, X. L.; DING, L.; YUAN, Y. L.; LI, H.; LI, X. T.; YAN, X. N.; WANG, L. L. Electrochemical sensor based on a poly(para-aminobenzoic acid) film modified glassy carbon electrode for the determination of melamine in milk. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 12, p. 4595-4602, 2011. DOI 10.1016/j.electacta.2011.02.088.

LIU, Z.; YU, W.; ZHANG, H.; GU, F.; JIN, X. Salting-out homogenous extraction followed by ionic liquid/ionic liquid liquid-liquid micro-extraction for determination of sulfonamides in blood by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 161, p. 748-754, 2016. DOI 10.1016/j.talanta.2016.09.006.

LOBATO, A.; FERNANDES, V. C.; PACHECO, J. G.; DELERUE-MATOS, C.; GONÇALVES, L. M. Organochlorine pesticide analysis in milk by gas-diffusion microextraction with gas chromatography-electron capture detection and confirmation by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1636, p. 461797, 2021. DOI 10.1016/j.chroma.2020.461797.

LORENZO, J. M.; MUNEKATA, P. E. S.; DOMÍNGUEZ, R. Role of autochthonous starter cultures in the reduction of biogenic amines in traditional meat products. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 61-65, 2017. DOI 10.1016/j.cofs.2017.01.009.

LOWDON, J. W.; DILIËN, H.; SINGLA, P.; PEETERS, M.; CLEIJ, T. J.; VAN GRINSVEN, B.; EERSELS, K. MIPs for commercial application in low-cost sensors and assays - an overview of the current status quo. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 325, p. 128973, 2020. DOI 10.1016/j.snb.2020.128973.

LUDWIG, I. A.; SÁNCHEZ, L.; DE PEÑA, M. P.; CID, C. Contribution of volatile compounds to the antioxidant capacity of coffee. **Food Research International**, v. 61, p. 67-74, 2014.

MA, L.; LIU, G. Simultaneous analysis of aalondialdehyde, 4-hydroxy-2-hexenal, and 4-hydroxy-2-nonenal in vegetable oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 51, p. 11320-11328, 2017. DOI 10.1021/acs.jafc.7b04566.

MACHEINER, L.; SCHMIDT, A.; KARPFF, F.; MAYER, H. K. A novel UHPLC method for determining the degree of coffee roasting by analysis of furans. **Food Chemistry**, v. 341, p. 128165, 2021. DOI 10.1016/j.foodchem.2020.128165.

MAGIERA, S.; KOLANOWSKA, A.; BARANOWSKI, J. Salting-out assisted extraction method coupled with hydrophilic interaction liquid chromatography for determination of selected β -blockers and their metabolites in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 1022, p. 93-101, 2016. DOI 10.1016/j.jchromb.2016.04.010.

MALITESTA, C.; MAZZOTTA, E.; PICCA, R. A.; POMA, A.; CHIANELLA, I.; PILETSKY, S. A. MIP sensors - the electrochemical approach. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 5, p. 1827-1846, 2012. DOI 10.1007/s00216-011-5405-5.

MANCHA AGRESTI, P. D. C.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; AUGUSTI, R. Discrimination between defective and non-defective Brazilian coffee beans by their volatile profile. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 787-796, 2008. DOI 10.1016/j.foodchem.2007.06.019.

MARCHESAN, A. N.; MOTTA, I. L.; MACIEL FILHO, R.; MACIEL, M. R. W. Simulation of multi-stage lactic acid salting-out extraction using ethanol and ammonium sulfate. **Computer Aided Chemical Engineering**, v. 48, p. 1645-1650, 2020. DOI 10.1016/B978-0-12-823377-1.50275-5.

MARIN, K.; POŽRL, T.; ZLATIC, E.; PLESTENJAK, A. A new aroma index to determine the aroma quality of roasted and ground coffee during storage. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 442-447, 2008.

MARIÑO-REPIZO, L.; GOICOECHEA, H.; RABA, J.; CERUTTI, S. A simple, rapid and novel method based on salting-out assisted liquid-liquid extraction for ochratoxin A determination in beer samples prior to ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 8, p. 1622-1632, 2018. DOI 10.1080/19440049.2018.1486045.

MARINS, B. R.; TANCREDI, R. C. P.; GEMAL, A. L. **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária**: reflexões e práticas. Rio de Janeiro: EPSJV, 2014. 288 p.

MARTINS, F. C. O. L.; SENTANIN, M. A.; DE SOUZA, D. Analytical methods in food additives determination: compounds with functional applications. **Food Chemistry**, v. 272, p. 732-750, 2019. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.08.060.

MASATCIOGLU, T. M.; NG, P. K. W.; KOKSEL, H. Effects of formulation and extrusion cooking conditions on furfural and hydroxymethylfurfural content. **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 31-38, 2015. DOI 10.1016/j.jcs.2015.06.003.

MATHIEU-SCHEERS, E.; BOUDEN, S.; GRILLOT, C.; NICOLLE, J.; WARMONT, F.; BERTAGNA, V.; CAGNON, B.; VAUTRIN-UL, C. Trace anthracene electrochemical detection based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 848, n. 9, p. 113253, 2019.

MEIRINHO, S.; CAMPOS, G.; RODRIGUES, M.; FORTUNA, A.; FALCÃO, A.; ALVES, G. Salting-out assisted liquid-liquid extraction method optimized by design of experiments for the simultaneous high-performance liquid chromatography analysis of perampanel and stiripentol in mouse matrices. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 23, p. 4289-4304, 2020. DOI 10.1002/jssc.202000656.

MEY, E.; DE KLERCK, K.; DE MAERE, H.; DEWULF, L.; DERDELINCKX, G.; PEETERS, M. C.; FRAEYE, I.; VANDER HEYDEN, Y.; PAELINCK, H. The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. **Meat Science**, v. 96, n. 2, p. 821-828, 2014.

MIETZ, J. L.; KARMAS, E. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 1, p. 155-158, 1977.

MILHEIRO, J.; FERREIRA, L. C.; FILIPE-RIBEIRO, L.; COSME, F.; NUNES, F. M. A simple dispersive solid phase extraction clean-up/concentration method for selective and sensitive quantification of biogenic amines in wines using benzoyl chloride derivatisation, **Food Chemistry**, v. 274, p. 110-117, 2019.

MOHAMMED, G. I.; BASHAMMAKH, A. S.; ALSIBAAI, A. A.; ALWAEEL, H.; EL-SHAHAWI, M. S. A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. **TrAC: Trends in Analytical Chemistry**, v. 78, p. 84-94, 2016.

MORENO-GONZÁLEZ, D.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of tetracycline residues in infant foods. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1763-1769, 2017.

MORENO-GONZÁLEZ, D.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, R.; DEL OLMO-IRUELA, M.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Validation of a new method based on salting-out assisted liquid-liquid extraction and UHPLC-MS/MS for the determination of betalactam antibiotics in infant dairy products. **Talanta**, v. 167, p. 493-498, 2017. DOI 10.1016/j.talanta.2017.02.045.

MORO, G.; BOTTARI, F.; SLEEGERS, N.; FLOREA, A.; COWEN, T.; MORETTO, L. M.; PILETSKY, S.; DE WAEEL, K. Conductive imprinted polymers for the direct electrochemical detection of β -lactam antibiotics: the case of cefquinome. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 297, p. 126786, 2019. DOI 10.1016/j.snb.2019.126786.

MORTAS, M.; GUL, O.; YAZICI, F.; DERVISOĞLU, M. Effect of brewing process and sugar content on 5-hydroxymethylfurfural and related substances from Turkish coffee. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 8, p. 1866-1875, 2017. DOI 10.1080/10942912.2016.1222587.

MOSKVIN, L. N.; NIKITINA, T. G. Membrane methods of substance separation in analytical chemistry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 2-16, 2004. DOI 10.1023/B:JANC.0000011661.47796.b2.

MUNIR, M. A.; BADRI, K. H. The importance of derivatizing reagent in chromatography applications for biogenic amine detection in food and beverages. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2020, p. 1-14, 2020. DOI 10.1155/2020/5814389.

MURKOVIC, M.; BORNIK, M. A. Formation of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) and 5-hydroxymethyl-2-furoic acid during roasting of coffee. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 4, p. 390-394, 2007. DOI 10.1002/mnfr.200600251.

MURKOVIC, M.; PICHLER, N. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, n. 9, p. 842-846, 2006. DOI 10.1002/mnfr.200500262.

NASCIMENTO, A. L.; ANDRADE, S. L. L. S. de. Segurança alimentar e nutricional: pressupostos para uma nova cidadania?. **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 4, p. 34-38, 2010.

NDUNDA, E. N. Molecularly imprinted polymers - a closer look at the control polymer used in determining the imprinted factor: a mini review. **Journal of Molecular Recognition**, v. 33, n. 11, 2020.

NEMEŠKALOVÁ, A.; BURSOVÁ, M.; SÝKORA, D.; KUCHAR, M.; ČABALA, R.; HLOŽEK, T. Salting out assisted liquid-liquid extraction for liquid chromatography tandem-mass spectrometry determination of amphetamine-like stimulants in meconium. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 172, p. 42-49, 2019. DOI 10.1016/j.jpba.2019.04.036.

NGUYEN, H. T.; VAN DER FELS-KLERX, H. J.; PETERS, R. J. B.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: part I: effects of sugar type. **Food Chemistry**, v. 192, p. 575-585, 2016. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.07.016.

NIQUET-LÉRIDON, C.; JACOLOT, P.; NIAMBA, C. N.; GROSSIN, N.; BOULANGER, E.; TESSIER, F. J. The rehabilitation of raw and brown butters by the measurement of two of the major Maillard products, *N*^ε-carboxymethyl-lysine and 5-hydroxymethylfurfural, with validated chromatographic methods. **Food Chemistry**, v. 177, p. 361-368, 2015. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.01.011.

NIU, Z.; YU, C.; HE, X.; ZHANG, J.; WEN, Y. Salting-out assisted liquid-liquid extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of pyrethroid insecticides in high salinity and biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 143, p. 222-227, 2017. DOI 10.1016/j.jpba.2017.05.046.

NOCHE, G. G.; LAESPADA, M. E. F.; PAVÓN, J. L. P.; CORDERO, B. M.; LORENZO, S. M. In situ aqueous derivatization and determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs by salting-out-assisted liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 37, p. 6240-6247, 2011. DOI 10.1016/j.chroma.2011.06.112.

NOWSHAD, F.; ISLAM, M. N.; KHAN, M. S. Concentration and formation behavior of naturally occurring formaldehyde in foods. **Agriculture & Food Security**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2018. DOI 10.1186/s40066-018-0166-4.

OKARU, A. O.; SCHARINGER, A.; REZENDE, T. R. de; TEIPEL, J.; KUBALLA, T.; WALCH, S. G.; LACHENMEIER, D. W. Validation of a quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopic screening method for coffee quality and authenticity (NMR coffee screener). **Foods**, v. 9, n. 1, p. 47, 2020. DOI 10.3390/foods9010047.

OLIVEIRA, I. G. C.; QUEIROZ, M. E. C. A micro salting-out assisted liquid-liquid extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine anandamide and 2-arachidonoylglycerol in rat brain samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1158, p. 122351, 2020. DOI 10.1016/j.jchromb.2020.122351.

ÖNAL, A.; TEKKELE, S. E. K.; ÖNAL, C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 509-515, 2013. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.10.056.

ORTEGA, A. C.; BORGES, M. S. Codex Alimentarius: a segurança alimentar sob a ótica da qualidade. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 19, n. 1, p. 71, 2015. DOI 10.20396/san.v19i1.8634670.

OWEN, D. A. A. The effects of histamine and some histamine-like agonists on blood pressure in the cat. **British Journal of Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 173-179, 1975.

ÖZYURT, G.; GÖKDOĞAN, S.; ŞİMŞEK, A.; YUVKA, I.; ERGÜVEN, M.; KULEY BOGA, E. Fatty acid composition and biogenic amines in acidified and fermented fish silage: a comparison study. **Archives of Animal Nutrition**, v. 70, n. 1, p. 72-86, 2016.

PACHECO, J. G.; REBELO, P.; CAGIDE, F.; GONÇALVES, L. M.; BORGES, F.; RODRIGUES, J. A.; DELERUE-MATOS, C. Electrochemical sensing of the thyroid hormone thyronamine (T₀AM) via molecular imprinted polymers (MIPs). **Talanta**, v. 194, p. 689-696, 2019. DOI 10.1016/j.talanta.2018.10.090.

PACHECO, J. G.; VALENTE, I. M.; GONÇALVES, L. M.; MAGALHÃES, P. J.; RODRIGUES, J. A.; BARROS, A. A. Development of a membraneless extraction module for the extraction of volatile compounds: application in the chromatographic analysis of vicinal diketones in beer. **Talanta**, v. 81, n. 1-2, p. 372-376, 2010a. DOI 10.1016/j.talanta.2009.12.011.

PACHECO, J. G.; VALENTE, I. M.; GONÇALVES, L. M.; RODRIGUES, J. A.; BARROS, A. A. Gas-diffusion microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 20, p. 3207-3212, 2010b. DOI 10.1002/jssc.201000351.

PAIANO, V.; BIANCHI, G.; DAVOLI, E.; NEGRI, E.; FANELLI, R.; FATTORE, E. Risk assessment for the Italian population of acetaldehyde in alcoholic and non-alcoholic beverages. **Food Chemistry**, v. 154, p. 26-31, 2014. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.12.098.

PARCHAMI, R.; KAMALABADI, M.; ALIZADEH, N. Determination of biogenic amines in canned fish samples using head-space solid phase microextraction based on nanostructured polypyrrole fiber coupled to modified ionization region ion mobility spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1481, p. 37-43, 2017.

PARK, H. J.; JUNG, M. Y. One step salting-out assisted liquid-liquid extraction followed by UHPLC-ESI-MS/MS for the analysis of isoflavones in soy milk. **Food Chemistry**, v. 229, p. 797-804, 2017. DOI 10.1016/j.foodchem.2017.02.145.

PARK, S. P.; LEE, C. H.; KWON, E. Y.; LEE, H. J.; KIM, J. Y.; KIM, S. H. Monitoring the contents of biogenic amines in fish and fish products consumed in Korea. **Food Control**, v. 21, p. 1219-1226, 2010.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. D. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008. DOI 10.1590/S0100-40422008000500048.

PASTOR-BELDA, M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A. J.; CAMPILLO, N.; PÉREZ-CÁRCELES, M. D.; MOTAS, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M.; VIÑAS, P. Glyoxal and methylglyoxal as urinary markers of diabetes. Determination using a dispersive liquid-liquid microextraction procedure combined with gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1509, p. 43-49, 2017. DOI 10.1016/j.chroma.2017.06.041.

PATANGE, S. B.; MUKUNDAN, M. K.; KUMAR, K. A. A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. **Food Control**, v. 16, p. 465-472, 2005.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002. DOI 10.1590/s0100-40422002000600019.

PEREIRA, E. A.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Laser-induced fluorescence and UV detection of derivatized aldehydes in air samples using capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 979, n. 1-2, p. 409-416, 2002. DOI 10.1016/S0021-9673(02)01258-X.

PEREIRA, G. V. M.; SOCCOL, V. T.; PANDEY, A.; MEDEIROS, A. B. P.; LARA, J. M. R. A.; GOLLO, A. L.; SOCCOL, C. R. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 60-66, 2014. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008.

PEREIRA, V.; ALBUQUERQUE, F. M.; FERREIRA, A. C.; CACHO, J.; MARQUES, J. C. Evolution of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural (F) in fortified wines submitted to overheating conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 71-76, 2011. DOI 10.1016/j.foodres.2010.11.011.

PÉREZ-BURILLO, S.; JIMÉNEZ-ZAMORA, A.; PÁRRAGA, J.; RUFÍÁN-HENARES, J. A.; PASTORIZA, S. Furosine and 5-hydroxymethylfurfural as chemical markers of tea processing and storage. **Food Control**, v. 99, p. 73-78, 2019. DOI 10.1016/j.foodcont.2018.12.029.

PERNITES, R.; PONNAPATI, R.; FELIPE, M. J.; ADVINCULA, R. Electropolymerization molecularly imprinted polymer (E-MIP) SPR sensing of drug molecules: pre-polymerization complexed terthiophene and carbazole electroactive monomers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 2766-2771, 2011. DOI 10.1016/j.bios.2010.10.027.

PESAVENTO, M.; CENNAMO, N.; ZENI, L.; DE MARIA, L.; ALBERTI, G.; MERLI, D. Single drop detection of furfural in wine by an SPR sensor based on molecularly imprinted polymer as biomimetic receptor. **Proceedings**, v. 60, n. 22, 2020. DOI 10.3390/iecb2020-07028.

PESAVENTO, M.; MERLI, D.; BIESUZ, R.; ALBERTI, G.; MARCHETTI, S.; MILANESE, C. A MIP-based low-cost electrochemical sensor for 2-furaldehyde detection in beverages. **Analytica Chimica Acta**, v. 1142, p. 201-210, 2021. DOI 10.1016/j.aca.2020.10.059.

PESEZ, M; POIRIER, R. **Méthodes et réactions de l'analyse organique III: réactions coloreés et fluorescences**. Paris: Masson et Cie Paris, 1954. 297 p.

PETISCA, C.; HENRIQUES, A. R.; PÉREZ-PALACIOS, T.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Assessment of hydroxymethylfurfural and furfural in commercial bakery products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 20–25, 2014. DOI 10.1016/j.jfca.2013.10.004.

PETISCA, C.; PÉREZ-PALACIOS, T.; FARAH, A.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Furans and other volatile compounds in ground roasted and espresso coffee using headspace solid-phase microextraction: effect of roasting speed. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 3, p. 233-241, 2013. DOI 10.1016/j.fbp.2012.10.003.

PIETRA, G. G., SZIDON, J. P., LEVENTHAL, M. M., FISHMAN, A. P. Histamine and interstitial pulmonary edema in dog. **Circulation Research: Journal of the american heart association**, v. 29, n. 4, p. 323-337, 1971. DOI 10.1161/01.res.29.4.323.

PIMENTA, C. J.; ANGÉLICO, C. L.; CHALFOUN, S. M. Challengings in coffee quality: cultural, chemical and microbiological aspects. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 42, v. 4, p. 337-349, 2018.

POCHIVALOV, A.; VAKH, C.; ANDRUCH, V.; MOSKVIN, L.; BULATOV, A. Automated alkaline-induced salting-out homogeneous liquid-liquid extraction coupled with in-line organic-phase detection by an optical probe for the determination of diclofenac. **Talanta**, v. 169, p. 156-162, 2017. DOI 10.1016/j.talanta.2017.03.074.

POLOVKOVÁ, M.; ŠIMKO, P. Determination and occurrence of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in white and brown sugar by high performance liquid chromatography. **Food Control**, v. 78, p. 183-186, 2017. DOI 10.1016/j.foodcont.2017.02.059.

POVEDA, J. M.; RUIZ, P.; SESEÑA, S.; PALOP, M. L. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria during a craft brewing process. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 129-136, 2017. DOI 10.1016/j.lwt.2017.07.003.

PRESTER, L. Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 11, p. 1547-1560, 2011.

PRIETO-BLANCO, M. C.; IGLESIAS, M. P.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; LORENZO, S. M.; RODRÍGUEZ, D. P. Simultaneous determination of carbonyl compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter by liquid chromatography-diode array detection-fluorescence detection. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 2083-2092, 2010. DOI 10.1016/j.talanta.2009.11.009.

PROPST, E. L.; FLICKINGER, E. A.; BAUER, L. L.; MERCHEN, N. R.; FAHEY, G. C. A dose-response experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on nutrient digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 12, p. 3057-3066, 2003. DOI 10.2527/2003.81123057x.

QUARTA, B.; ANESE, M. Furfurals removal from roasted coffee powder by vacuum treatment. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 610-614, 2012. DOI 10.1016/j.foodchem.2011.07.083.

RAMÍREZ-GUÍZAR, S.; GONZÁLEZ-ALATORRE, G.; PÉREZ-PÉREZ, M. C. I.; PIÑEIRO-GARCÍA, A.; LONA-RAMÍREZ, F. J. Identification and quantification of volatile toxic compounds in tequila. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 14, n. 4, p. 2059-2066, 2020. DOI 10.1007/s11694-020-00452-x.

RAMOS, R. M.; BRANDÃO, P. F.; RODRIGUES, J. A. Development of a SALLE-HPLC-FLD analytical method for the simultaneous determination of ten biogenic amines in cheese. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 5, p. 1088-1098, 2020. DOI 10.1007/s12161-020-01730-6.

RAMOS, R. M.; GONÇALVES, L. M.; VYSKOČIL, V.; RODRIGUES, J. A. Free sulphite determination in wine using screen-printed carbon electrodes with prior gas-diffusion microextraction. **Electrochemistry Communications**, v. 63, p. 52-55, 2016. DOI 10.1016/j.elecom.2015.12.010.

RAMOS, R. M.; VALENTE, I. M.; RODRIGUES, J. A. Analysis of biogenic amines in wines by salting-out assisted liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Talanta**, v. 124, p. 146-151, 2014.

RAZMARA, R. S.; DANESHFAR, A.; SAHRAI, R. Determination of methylene blue and sunset yellow in wastewater and food samples using salting-out assisted liquid-liquid extraction. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 533-536, 2011. DOI 10.1016/j.jiec.2010.10.028.

RESTUCCIA, D.; LOIZZO, M. R.; SPIZZIRRI, U. G. Accumulation of biogenic amines in wine: Role of alcoholic and malolactic fermentation. **Fermentation**, v. 4, n. 6, p. 1-18, 2018. DOI 10.3390/fermentation4010006.

REYES-SALAS, E. O.; MANZANILLA-CANO, J. A.; BARCELÓ-QUINTAL, M. H.; JUÁREZ-MENDOZA, D.; REYES-SALAS, M. Direct electrochemical determination of hydroxymethylfurfural (HMF) and its application to honey samples. **Analytical Letters**, v. 39, n. 1, p. 161-171, 2006. DOI 10.1080/00032710500423476.

REZENDE, F. B. F.; CHEIBUB, A. M. S. S.; NETTO, A. D. P.; MARQUES, F. F. C. Determination of formaldehyde in bovine milk using a high sensitivity HPLC-UV method. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 383-389, 2017. DOI 10.1016/j.microc.2017.07.003.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, J. S.; AUGUSTO, F.; SALVA, T. J. G.; FERREIRA, M. M. C. Prediction models for Arabica coffee beverage quality based on aroma analyses and chemometrics. **Talanta**, v. 101, p. 253-260, 2012. DOI 10.1016/j.talanta.2012.09.022.

RIBEIRO, J. S.; AUGUSTO, F.; SALVA, T. J. G.; THOMAZIELLO, R. A.; FERREIRA, M. M. C. Prediction of sensory properties of Brazilian Arabica roasted coffees by headspace solid phase microextraction-gas chromatography and partial least squares. **Analytica Chimica Acta**, v. 634, n. 2, p. 172-179, 2009. DOI 10.1016/j.aca.2008.12.028.

RIZELIO, V. M.; GONZAGA, L. V.; BORGES, G. da S. C.; MICKE, G. A.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Development of a fast MECK method for determination of 5-HMF in honey samples. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1640-1645, 2012. DOI 10.1016/j.foodchem.2011.11.058.

RIZZI, G. P. Formation of strecker aldehydes from polyphenol-derived quinones and α -amino acids in a nonenzymic model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1893-1897, 2006. DOI 10.1021/jf052781z.

RIZZO, S.; RUSSO, M.; LABRA, M.; CAMPONE, L.; RASTRELLI, L. Determination of chloramphenicol in honey using salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry and validation according to 2002/657 european commission decision. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 1-13, 2020. DOI 10.3390/molecules25153481.

RODRIGUES, J. A.; GONÇALVES, L. M.; BARROS, A. A.; PACHECO, J. G. **Extractor module and extraction process of voltage and semi-voltage species based on gaseous diffusion**. Depositante: Universidade do Porto, Portugal, PT104789. Depósito: 18 Abr. 2011. Concessão: 6 Mai. 2013.

ROHANI, F. G.; MOHADESI, A.; ANSARI, M. A new diosgenin sensor based on molecularly imprinted polymer of para aminobenzoic acid selected by computer-aided design. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p. 552-560, 2019. DOI 10.1016/j.jpba.2019.04.044.

ROKKA, M.; EEROLA, S.; SMOLANDER, M.; ALAKOMI, H. L.; AHVENAINEN, R. Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions: B. Biogenic amines as quality-indicating metabolites. **Food Control**, v. 15, n. 8, p. 601-607, 2004. DOI 10.1016/j.foodcont.2003.10.002.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; ALARCÓN-FLORES, M. I.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G. Simultaneous determination of four biogenic and three volatile amines in anchovy by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 21, p. 5324-5329, 2012.

ROY, B. C.; AWUAL, M. R.; GOTO, M. Effect of inorganic salts on ternary equilibrium data of propionic acid-water-solvents systems. **Journal of Applied Sciences**, v. 7, n. 7, p. 1053-1060, 2007.

RUFÍÁN-HENARES, J. A.; DE LA CUEVA, S. P. Assessment of hydroxymethylfurfural intake in the Spanish diet. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 25, n. 11, p. 1306-1312, 2008. DOI 10.1080/02652030802163406.

RUIZ-CAPILLAS, C.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Biogenic amines in meat and meat products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 7-8, p. 489-499, 2004.

RUOSI, M. R.; CORDERO, C.; CAGLIERO, C.; RUBIOLO, P.; BICCHI, C.; SGORBINI, B.; LIBERTO, E. A further tool to monitor the coffee roasting process: aroma composition and chemical indices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 45, p. 11283-11291, 2012. DOI 10.1021/jf3031716.

SAGRATINI, G.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; DE BERARDINIS, F.; FONT, G.; VITTORI, S.; MAÑES, J. Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 537-543, 2012.

SALASPURO, M. Acetaldehyde and gastric cancer. **Journal of Digestive Diseases**, v. 12, n. 2, p. 51-59, 2011. DOI 10.1111/j.1751-2980.2011.00480.x.

SALHI, I.; SAMET, Y.; TRABELSI, M. Direct electrochemical determination of very low levels of 5-hydroxymethyl furfural in natural honey by cyclic and square wave voltammetric techniques. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 873, p. 114326, 2020. DOI 10.1016/j.jelechem.2020.114326.

SARKADI, L. S. Biogenic amines. In: STADLER, R. H.; LINEBACK, D. R. (ed.). **Process-induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. Chap. 3.2, p. 321-362.

SÁNCHEZ, M. D. N.; SANTOS, P. M.; SAPPÓ, C. P.; PAVÓN, J. L. P.; CORDERO, B. M. Microextraction by packed sorbent and salting-out-assisted liquid-liquid extraction for the determination of aromatic amines formed from azo dyes in textiles. **Talanta**, v. 119, p. 375-384, 2014. DOI 10.1016/j.talanta.2013.11.041.

SAYEM-EL-DAHER, N.; SIMARD, R. E.; FILLION, J.; ROBERGE, A. G. Extraction and determination of biogenic amines in ground beef and their relation to microbial quality. **Lebensmittel - Wissenschaft + Technologie**, v. 17, n. 1, p. 20-23, 1984.

SAZALI, N. H.; ALSHISHANI, A.; SAAD, B.; CHEW, K. Y.; CHONG, M. M.; MISKAM, M. Salting-out assisted liquid–liquid extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of vitamin D3 in milk samples. **Royal Society Open Science**, v. 6, n. 8, 2019. DOI 10.1098/rsos.190952.

SENTELLAS, S.; NÚÑEZ, Ó.; SAURINA, J. Recent advances in the determination of biogenic amines in food samples by (U)HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 41, p. 7667-7678, 2016.

SERESHTI, H.; KHOSRAVIANI, M.; SADEGH AMINI-FAZL, M. Miniaturized salting-out liquid-liquid extraction in a coupled-syringe system combined with HPLC-UV for extraction and determination of sulfanilamide. **Talanta**, v. 121, p. 199-204, 2014. DOI 10.1016/j.talanta.2014.01.005.

SERRA-CAYUELA, A.; CASTELLARI, M.; BOSCH-FUSTÉ, J.; RIU-AUMATELL, M.; BUXADERAS, S.; LÓPEZ-TAMAMES, E. Identification of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) in Cava sparkling wines by LC-DAD-MS/MS and NMR spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3373-3380, 2013. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.05.158.

SERRANO, M.; GALLEGÓ, M.; SILVA, M. Origin of low-molecular mass aldehydes as disinfection by-products in beverages. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 34, n. 9, p. 1461-1473, 2017a. DOI 10.1080/19440049.2017.1346393

SERRANO, M.; GALLEGÓ, M.; SILVA, M. Quantitative analysis of aldehydes in canned vegetables using static headspace–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1524, p. 21-28, 2017b. DOI 10.1016/j.chroma.2017.09.067.

SHAKILA, R. J.; VIJAYALAKSHMI, K.; JEYASEKARAN, G. Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. **Food Chemistry**, v. 82, n. 3, p. 347-352, 2003. DOI 10.1016/S0308-8146(02)00552-6.

SHAPLA, U. M.; SOLAYMAN, M.; ALAM, N.; KHALIL, M. I.; GAN, S. H. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2018. DOI 10.1186/s13065-018-0408-3.

SHIBAMOTO, T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 1, p. 12-25, 2006. DOI 10.1016/j.jpba.2006.01.047.

SILVA, C. P. da; DALPIAZ, L. P. P.; GERBASE, F. E.; MULLER, V. V.; SILVA, A. C. da; LIZOT, L. F.; HAHN, R. Z.; COSTA, J. L. da; ANTUNES, M. V.; LINDEN, R. Determination of cannabinoids in plasma using salting-out-assisted liquid-liquid extraction followed by LC-MS/MS analysis. **Biomedical Chromatography**, v. 34, n. 12, p. 1-8, 2020. DOI 10.1002/bmc.4952.

SILVA, J. L. da. **Detecção eletroquímica de furfural e hidroximetilfurfural em bagaço da cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência**. Orientador: Nelson Ramos Stradiotto. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

- ŠIMAT, V.; DALGAARD, P. Use of small diameter column particles to enhance HPLC determination of histamine and other biogenic amines in seafood. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 399-406, 2011.
- SOARES, J. M.; GOMES, J. M.; REIS, G. C. L.; HOYOS, D. C. M.; CUSTÓDIO, F. B.; GLÓRIA, M. B. A. Biogenic amines in amazonian fish and their health effects are affected by species and season capture. **Food Control**, v. 123, n. 5, p. 107773, 2021.
- SONG, S.; EDIAGE, E. N.; WU, A.; DE SAEGER, S. Development and application of salting-out assisted liquid/liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 111-120, 2013. DOI 10.1016/j.chroma.2012.10.071.
- SOUZA, D. de; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003. DOI 10.1590/s0100-40422003000100015.
- SPANO, G.; RUSSO, P.; LONVAUD-FUNEL, A.; LUCAS, P.; ALEXANDRE, H.; GRANDVALET, C.; COTON, E.; COTON, M.; BARNAVON, L.; BACH, B.; RATTRAY, F.; BUNTE, A.; MAGNI, C.; LADERO, V.; ALVAREZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; LOPEZ, P.; PALENCIA, P. F. de.; CORBI, A.; TRIP, H.; LOLKEMA, J. S. Biogenic amines in fermented foods. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, p. S95-S100, 2010.
- SPARIDANS, R. W.; VAN HOPPE, S.; ROOD, J. J. M.; SCHINKEL, A. H.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for the tyrosine kinase inhibitor afatinib in mouse plasma using salting-out liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 1012-1013, p. 118-123, 2016. DOI 10.1016/j.jchromb.2016.01.025.
- SPIETELUN, A.; MARCINKOWSKI, L.; GUARDIA, M. de la; NAMIESNIK, J.; Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. **Talanta**, v. 119, p. 34-45, 2014.
- STANDAGE, T. O combustível da guerra. In: STANDAGE, T. **Uma história comestível da humanidade**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 2010. Cap. 9, p. 157-182.
- STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 159-173, 2003. DOI 10.1590/S0103-50532003000200003.
- STRATIGOU, I. C.; TSIASIOTI, A.; TZANAVARAS, P. D.; MARKOPOULOU, C. K.; FYTIANOS, K.; ZACHARIS, C. K. Homogeneous liquid liquid extraction using salt as mass separating agent for the ultra high pressure liquid chromatographic determination of doxorubicin in human urine. **Microchemical Journal**, v. 158, p. 105260, 2020. DOI 10.1016/j.microc.2020.105260.
- TABANELLI, G.; MONTANARI, C.; GARDINI, F. Biogenic amines in food: a review of factors affecting their formation. **Encyclopedia of Food Chemistry**, v. 1, p. 337-343, 2019. DOI 10.1016/B978-0-08-100596-5.21833-7.
- TABARAKI, R.; HEIDARIZADI, E. Spectrophotometric determination of phenol and chlorophenols by salting out assisted liquid-liquid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 215, p. 405-409, 2019. DOI 10.1016/j.saa.2019.02.060.

TABOR, C. W.; ROSENTHAL S. M. Pharmacology of spermine and spermidine: some effects on animals and bacteria. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 116, n. 2, p. 139-155, 1956.

TABOR, H.; TABOR, C. W. Spermidine, spermine, and related amines. **Pharmacological Reviews**, v. 16, n. 3, p. 245-300, 1964.

TANDEL, D.; SHAH, P.; PATEL, K.; THAKKAR, V.; PATEL, K.; GANDHI, T. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for quantification of febuxostat in plasma using RP-HPLC and its pharmacokinetic application. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 10, p. 1827-1833, 2016. DOI 10.1093/chromsci/bmw124.

TAPRAB, N.; SAMEENOI, Y. Rapid screening of formaldehyde in food using paper-based titration. **Analytica Chimica Acta**, v. 1069, p. 66-72, 2019. DOI 10.1016/j.aca.2019.03.063.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiéticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.

TEIXIDÓ, E.; NÚÑEZ, O.; SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1902-1908, 2011. DOI 10.1016/j.foodchem.2010.12.016.

TEIXIDÓ, E.; SANTOS, F. J.; PUIGNOU, L.; GALCERAN, M. T. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, n. 1, p. 85-90, 2006. DOI 10.1016/j.chroma.2006.09.023.

TEJADA-CASADO, C.; DEL OLMO-IRUELA, M.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; LARA, F. J. Green and simple analytical method to determine benzimidazoles in milk samples by using salting-out assisted liquid-liquid extraction and capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1091, p. 46-52, 2018a. DOI 10.1016/j.jchromb.2018.05.024.

TEJADA-CASADO, C.; LARA, F. J.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; DEL OLMO-IRUELA, M. Ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection following salting-out assisted liquid-liquid extraction for the analysis of benzimidazole residues in farm fish samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1543, p. 58-66, 2018b. DOI 10.1016/j.chroma.2018.02.042.

TEMEL, N. K.; GÜRKAN, R. Extraction, preconcentration, and quantification of low levels of free formaldehyde from some beverage matrices by combination of ultrasound-assisted-cloud point extraction with spectrophotometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 12, p. 4024-4037, 2017. DOI 10.1007/s12161-017-0973-4.

TIGHRINE, A.; AMIR, Y.; ALFARO, P.; MAMOU, M.; NERÍN, C. Simultaneous extraction and analysis of preservatives and artificial sweeteners in juices by salting out liquid-liquid extraction method prior to ultra-high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 277, p. 586-594, 2019. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.10.107.

TOCI, A. T.; FARAH, A. Volatile compounds as potential defective coffee beans' markers. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1133-1141, 2008. DOI 10.1016/j.foodchem.2007.11.064.

TOCI, A. T.; FARAH, A. Volatile fingerprint of Brazilian defective coffee seeds: corroboration of potential marker compounds and identification of new low quality indicators. **Food Chemistry**, v. 153, p. 298-314, 2014. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.12.040.

TOLEDO, P. R. A. B.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R.; TOCI, A. T. Relationship between the different aspects related to coffee quality and their volatile compounds. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 705-719, 2016. DOI 10.1111/1541-4337.12205.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M. R. F.; CALDAS, S. S.; BUFFON, J. G.; DUARTE, F. A.; PRIMEL, E. G. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 99, p. 380-386, 2012. DOI 10.1016/j.talanta.2012.05.068.

TRIKI, M.; HERRERO, A. M.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; RUIZ-CAPILLAS, C. Quality assessment of fresh meat from several species based on free amino acid and biogenic amine contents during chilled storage. **Foods**, v. 7, n. 9, p. 132, 2018. DOI 10.3390/foods7090132.

TRUZZI, C.; ANNIBALDI, A.; ILLUMINATI, S.; FINALE, C.; ROSSETTI, M.; SCARPONI, G. Determination of very low levels of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) in natural honey: comparison between the HPLC technique and the spectrophotometric white method. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, p. C784-C790, 2012. DOI 10.1111/j.1750-3841.2012.02782.x.

TSOCHATZIS, E. D.; MIETH, A.; ALBERTO LOPES, J.; SIMONEAU, C. A salting-out liquid-liquid extraction (SALLE) for the analysis of caprolactam and 2,4-di-tert butyl phenol in water and food simulants. Study of the salinity effect to specific migration from food contact materials. **Journal of Chromatography B**, v. 1156, p. 122301, 2020. DOI 10.1016/j.jchromb.2020.122301.

URLINGS, H. A.; BIJKER, P. G.; VAN LOGTESTIJN, J. G. Fermentation of raw poultry byproducts for animal nutrition. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 9, p. 2420-2426, 1993.

VALENTE, I. M.; GONÇALVES, L. M.; RODRIGUES, J. A. Another glimpse over the salting-out assisted liquid-liquid extraction in acetonitrile/water mixtures. **Journal of Chromatography A**, v. 1308, p. 58-62, 2013.

VALENTE, I. M.; MOREIRA, M. M.; NEVES, P.; DA FÉ, T.; GONÇALVES, L. M.; ALMEIDA, P. J.; RODRIGUES, J. A. An insight on salting-out assisted liquid-liquid extraction for phytoanalysis. **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 4, p. 297-304, 2017a. DOI 10.1002/pca.2676.

VALENTE, I. M.; OLIVEIRA, H. M.; VAZ, C. D.; RAMOS, R. M.; FONSECA, A. J. M.; CABRITA, A. R. J.; RODRIGUES, J. A. Determination of ammonia nitrogen in solid and liquid high-complex matrices using one-step gas-diffusion microextraction and fluorimetric detection. **Talanta**, v. 167, n. 687, p. 747-753, 2017b. DOI 10.1016/j.talanta.2017.01.091.

VALENTE, I. M.; RAMOS, R. M.; GONÇALVES, L. M.; RODRIGUES, J. A. Determination of ethyl carbamate in spirits using salting-out assisted liquid-liquid extraction and high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Analytical Methods**, v. 6, n. 22, p. 9136-9141, 2014. DOI 10.1039/c4ay02075h.

VALENTE, M. A. G.; GONÇALVES, L. M.; FILHO, J. P.; CARDOSO, A. A.; RODRIGUES, J. A.; FUGIVARA, C. S.; BENEDETTI, A. V. Corrosion protection of steel by volatile corrosion inhibitors: vapor analysis by gas-diffusion microextraction and mass loss and electrochemical impedance in nacl deliquescence tests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 10, p. 2038-2048, 2020. DOI 10.21577/0103-5053.20200104.

VANDERHAEGEN, B.; DELVAUX, F.; DAENEN, L.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F. R. Aging characteristics of different beer types. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 404-412, 2007. DOI 10.1016/j.foodchem.2006.07.062.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging - a critical review. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 357-381, 2006. DOI 10.1016/j.foodchem.2005.01.006.

VASAPOLLO, G.; SOLE, R. Del; MERGOLA, L.; LAZZOI, M. R.; SCARDINO, A.; SCORRANO, S.; MELE, G. Molecularly imprinted polymers: present and future prospective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 9, p. 5908-5945, 2011. DOI 10.3390/ijms12095908.

VECIANA-NOGUÉS, M. T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2036-2041, 1997.

VIGNOLI, J. A.; VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. de T. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Research International**, v. 61, p. 279-285, 2014. DOI 10.1016/j.foodres.2013.06.006.

VINCI, G.; ANTONELLI, M. L. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. **Food Control**, v. 13, n. 8, p. 519-524, 2002.

WAHED, P.; RAZZAQ, M. A.; DHARMAPURI, S.; CORRALES, M. Determination of formaldehyde in food and feed by an in-house validated HPLC method. **Food Chemistry**, v. 202, p. 476-483, 2016. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.01.136.

WANG, D. X.; WANG, X. C.; HU, Q. J.; ZHANG, C. X.; LI, F.; WANG, F. L.; FENG, Q. F. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled to dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of bisphenol A and six analogs (B, E, F, S, BADGE, BFDGE) in canned coffee drinks by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 14, n. 3, p. 441-452, 2021. DOI 10.1007/s12161-020-01879-0.

WANG, H.; ZHOU, X.; ZHANG, Y.; CHEN, H.; LI, G.; XU, Y.; ZHAO, Q.; SONG, W.; JIN, H.; DING, L. Dynamic microwave-assisted extraction coupled with salting-out liquid-liquid extraction for determination of steroid hormones in fish tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 41, p. 10343-10351, 2012. DOI 10.1021/jf303124c.

WANG, M.; CAI, Z.; XU, L. Coupling of acetonitrile deproteinization and salting-out extraction with acetonitrile stacking in chiral capillary electrophoresis for the determination of warfarin enantiomers. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 26, p. 4045-4051, 2011. DOI 10.1016/j.chroma.2011.04.067.

WANG, Q.; YIN, C. R.; XU, L. Optimization of hydrophilic interaction LC by univariate and multivariate methods and its combination with salting-out liquid-liquid extraction for the determination of antihypertensive drugs in the environmental waters. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 6, p. 1007-1014, 2013. DOI 10.1002/jssc.201200985.

WEI, Y.; WANG, M.; LIU, H.; NIU, Y.; WANG, S.; ZHANG, F.; LIU, H. Simultaneous determination of seven endogenous aldehydes in human blood by headspace gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1118-1119, p. 85-92, 2019. DOI 10.1016/j.jchromb.2019.04.027.

WEINROTH, M. D.; BELK, A. D.; BELK, K. E. History, development, and current status of food safety systems worldwide. **Animal Frontiers**, v. 8, n. 4, p. 9-15, 2018. DOI 10.1093/af/vfy016.

WHITE, J. W. Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 62, n. 3, p. 509-514, 1979. DOI 10.1093/jaoac/62.3.509.

WHO. **Food safety**. Geneva: WHO, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 11 out. 2021.

WHO. **Formaldehyde**. Geneva: WHO, 2002. (Concise international chemical assessment document, 40).

WHO. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases**: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Geneva: WHO, 2015. 255 p. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>. Acesso em: 12 out. 2021.

WOJNOWSKI, W.; NAMIEŚNIK, J.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for in situ determination of biogenic amines in meat: estimation of meat's freshness. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 130-138, 2019. DOI 10.1016/j.microc.2018.10.034.

WU, H.; ZHANG, J.; NOREM, K.; EL-SHOUBAGY, T. A. Simultaneous determination of a hydrophobic drug candidate and its metabolite in human plasma with salting-out assisted liquid/liquid extraction using a mass spectrometry friendly salt. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 4, p. 1243-1248, 2008. DOI 10.1016/j.jpba.2008.09.002.

WUNDERLICHOVÁ, L.; BUŇKOVÁ, L.; KOUTNÝ, M.; JANČOVÁ, P.; BUŇKA, F. Formation, degradation, and detoxification of putrescine by foodborne bacteria: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 5, p. 1012-1030, 2014. DOI 10.1111/1541-4337.12099.

XIA, Q.; YANG, Y.; LIU, M. Aluminium sensitized spectrofluorimetric determination of fluoroquinolones in milk samples coupled with salting-out assisted liquid-liquid ultrasonic extraction. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 96, p. 358-364, 2012. DOI 10.1016/j.saa.2012.05.048.

XIONG, X. J.; WANG, H.; RAO, W. B.; GUO, X. F.; ZHANG, H. S. 1,3,5,7-Tetramethyl-8-aminozide-difluoroboradiazas-indacene as a new fluorescent labeling reagent for the determination of aliphatic aldehydes in serum with high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 1, p. 49-56, 2010. DOI 10.1016/j.chroma.2009.11.003.

XIONG, X.; YANG, L. Salting-out-assisted liquid-liquid extraction with acetonitrile for the determination of trimetazidine in rat plasma using liquid chromatography-mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 2, p. 268-274, 2015. DOI 10.1002/bmc.3271.

XIONG, X.; ZHANG, L.; CHENG, L.; MAO, W. High-throughput salting-out assisted liquid-liquid extraction with acetonitrile for the determination of anandamide in plasma of hemodialysis patients with liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 9, p. 1317-1324, 2015. DOI 10.1002/bmc.3425.

XU, F.; GAO, M.; WANG, L.; SHI, G.; ZHANG, W.; JIN, L.; JIN, J. Sensitive determination of dopamine on poly(aminobenzoic acid) modified electrode and the application toward an experimental Parkinsonian animal model. **Talanta**, v. 55, n. 2, p. 329-336, 2001. DOI 10.1016/S0039-9140(01)00432-5.

XU, H.; LV, L.; HU, S.; SONG, D. High-performance liquid chromatographic determination of hexanal and heptanal in human blood by ultrasound-assisted headspace liquid-phase microextraction with in-drop derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2371-2375, 2010. DOI 10.1016/j.chroma.2009.09.068.

XU, H.; WANG, S.; ZHANG, G.; HUANG, S.; SONG, D.; ZHOU, Y.; LONG, G. A novel solid-phase microextraction method based on polymer monolith frit combining with high-performance liquid chromatography for determination of aldehydes in biological samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 690, n. 1, p. 86-93, 2011. DOI 10.1016/j.aca.2011.02.006.

XU, X. B.; LIU, D. B.; YU, S. J.; YU, P.; ZHAO, Z. G. Separation and determination of 4-methylimidazole, 2-methylimidazole and 5-hydroxymethylfurfural in beverages by amino trap column coupled with pulsed amperometric detection. **Food Chemistry**, v. 169, p. 224-229, 2015. DOI 10.1016/j.foodchem.2014.07.149.

YANG, L.; XU, B.; YE, H.; ZHAO, F.; ZENG, B. A novel quercetin electrochemical sensor based on molecularly imprinted poly(para-aminobenzoic acid) on 3D Pd nanoparticles-porous graphene-carbon nanotubes composite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 251, p. 601-608, 2017. DOI 10.1016/j.snb.2017.04.006.

YANG, N.; LIU, C.; LIU, X.; DEGN, T. K.; MUNCHOW, M.; FISK, I. Determination of volatile marker compounds of common coffee roast defects. **Food Chemistry**, v. 211, p. 206-214, 2016. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.04.124.

YANG, S.; LI, L.; ZHANG, X.; SHANG, P.; DING, S.; ZHA, W.; XU, W. Electrochemical determination of thrombin with molecularly imprinted polymers and multiwalled carbon nanotubes. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 95, n. 7, p. 799-805, 2017. DOI 10.1139/cjc-2017-0010.

YANG, Y.; XU, Q.; ZHOU, L.; ZHONG, D.; CHEN, X. High-throughput salting-out-assisted liquid-liquid extraction for the simultaneous determination of atorvastatin, ortho-hydroxyatorvastatin, and para-hydroxyatorvastatin in human plasma using ultrafast liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 6, p. 1026-1034, 2015. DOI 10.1002/jssc.201401227.

YAZDANFAR, N.; YAMINI, Y.; GHAMBARIAN, M. Homogeneous liquid-liquid microextraction for determination of organochlorine pesticides in water and fruit samples. **Chromatographia**, v. 77, n. 3-4, p. 329-336, 2014. DOI 10.1007/s10337-013-2604-6.

YI, C.; ZHANG, Y.; XIE, S.; SONG, W.; QIU, X. Salting-out extraction of bio-based isobutanol from an aqueous solution. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 372-384, 2018. DOI 10.1002/jctb.5365.

YOU, J.; YAN, T.; ZHAO, H.; SUN, Z.; XIA, L.; SUO, Y.; LI, Y. A sensitive fluorescence reagent for the determination of aldehydes from alcoholic beverage using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometric identification. **Analytica Chimica Acta**, v. 636, n. 1, p. 95-104, 2009. DOI 10.1016/j.aca.2009.01.036.

ZAPPALÀ, M.; FALLICO, B.; ARENA, E.; VERZERA, A. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. **Food Control**, v. 16, n. 3, p. 273-277, 2005. DOI 10.1016/j.foodcont.2004.03.006.

ZHAI, H.; YANG, X.; LI, L.; XIA, G.; CEN, J.; HUANG, H.; HAO, S. Biogenic amines in commercial fish and fish products sold in southern China. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 303-308, 2012.

ZHANG, J.; RODILA, R.; GAGE, E.; HAUTMAN, M.; FAN, L.; KING, L. L.; WU, H.; EL-SHOUBAGY, T. A. High-throughput salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile for the simultaneous determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 167-172, 2010. DOI 10.1016/j.aca.2009.12.023.

ZHANG, J.; WU, H.; KIM, E.; EL-SHOUBAGY, T. A. Salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile: a new high throughput sample preparation technique for good laboratory practice bioanalysis using liquid chromatography-mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 23, n. 4, p. 419-425, 2009. DOI 10.1002/bmc.1135.

ZHANG, L. L.; KONG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y. Y.; SUN, B. G.; CHEN, H. T.; SUN, Y. Kinetics of 5-hydroxymethylfurfural formation in the sugar-amino acid model of Maillard reaction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 5, p. 2340-2347, 2019. DOI 10.1002/jsfa.9432.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, Y.; LI, G. hui; YANG, W. zhen; FENG, X. song. A review of pretreatment and analytical methods of biogenic amines in food and biological samples since 2010. **Journal of Chromatography A**, v. 1605, p. 360361, 2019. DOI 10.1016/j.chroma.2019.07.015.

ZHANG, Y.; WANG, J.; XU, M. A sensitive DNA biosensor fabricated with gold nanoparticles/poly (p-aminobenzoic acid)/carbon nanotubes modified electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 179-185, 2010. DOI 10.1016/j.colsurfb.2009.08.030.

ZHAO, F. J.; TANG, H.; ZHANG, Q. H.; YANG, J.; DAVEY, A. K.; WANG, J. P. Salting-out homogeneous liquid-liquid extraction approach applied in sample pre-processing for the quantitative determination of entecavir in human plasma by LC-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 881-882, p. 119-125, 2012. DOI 10.1016/j.jchromb.2011.12.003.

ZHIAN, H.; NOROOZI PESYAN, N.; AALINEJAD, M.; RASHIDNEJAD, H.; NOTASH, B. Unexpected simple and catalyst-free condensation reaction of spiro dihydrofurans with 2,4-dinitrophenylhydrazine, thiosemicarbazide, and hydroxylamine for the synthesis of novel corresponding 4,4,6',6'-tetramethyl-3'-aryl-3',5',6',7'-tetrahydrospiro[cyclo. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 2563-2570, 2018. DOI 10.1002/jhet.3310.