



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

LUCIANO MOLOGNONI

**INTERAÇÕES DE CONSERVANTES NO PROCESSAMENTO DE CARNES:
FORMAÇÃO DE COMPOSTOS CARCINOGÊNICOS, MÉTODOS DE CONTROLE
E AGENTES INIBITÓRIOS**

FLORIANÓPOLIS

2019

LUCIANO MOLOGNONI

**INTERAÇÕES DE CONSERVANTES NO PROCESSAMENTO DE CARNES:
FORMAÇÃO DE COMPOSTOS CARCINOGÊNICOS, MÉTODOS DE CONTROLE
E AGENTES INIBITÓRIOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner

FLORIANÓPOLIS

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Molognoni, Luciano

INTERAÇÕES DE CONSERVANTES NO PROCESSAMENTO DE CARNES:
: FORMAÇÃO DE COMPOSTOS CARCINOGENICOS, MÉTODOS DE CONTROLE
E AGENTES INIBITÓRIOS / Luciano Molognoni ; orientador,
Juliano De Dea Lindner, 2019.

216 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Saúde pública. 3.
Conservantes. 4. Metrologia Química. 5. Segurança Alimentar.
I. De Dea Lindner, Juliano . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. III. Título.

Luciano Molognoni

Interações de conservantes no processamento de carnes: formação de compostos carcinogênicos, métodos de controle e agentes inibitórios

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Ana Lúcia da Silva Corrêa Lemos
Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)

Dr. Daniel Granato
Natural Resources Institute Finland (Luke)

Prof. Dr. Giustino Tribuzi
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Dr. Heitor Daguer
Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul (LFDA- RS)
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)

Prof. Dr. Luciano Vitali
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Ciência dos Alimentos

Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi
Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner
Orientador

Dedico esta obra ao meu filho Antonio e à minha esposa Joana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família: esposa Joana, meu “gordão” Titi, pai Toninho, mãe Ge, irmãs Ju e Fer, sogra Toco, cunhados Maurolla e Alemão e minha linda Lilicotta. Não podendo esquecer do Juca, Amy e Sofia. A essência do aprendizado, inquietude e tranquilidade.

À Universidade Federal de Santa Catarina que proporcionou toda a minha formação acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), com o fomento deste projeto de pesquisa intitulado “Novos métodos analíticos para controle químico de produtos cárneos”, número 635/2017.

À Seção Laboratorial Avançada de Santa Catarina (SLAV-SC), ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul (LFDA-RS) e ao Instituto Catarinense de Sanidade Agropecuária (ICASA) em aceitar e apoiar a execução deste projeto.

Ao Ministério Público Estadual do Rio Grande do Sul (MP-RS) pelo apoio à execução deste projeto de pesquisa.

Ao Laboratório de Orgânica do Departamento de Química (LAB-QMC) da Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Prof. Antonio Carlos Joussef e seu aluno Janh Rodrigues.

Ao Laboratórios de Bioprocessos e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC, em especial aos mestrandos Gabriel e Mariana.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), em especial à pesquisadora Dra. Ana Lucia da Silva Corrêa Lemos, pelas ideias, apoio e principalmente amizade.

A todos os funcionários, bolsistas e estagiários do LFDA-RS/SLAV-SC que trabalham e convivem comigo diariamente, em especial aos amigos Heitor Daguer e Fabiano Barreto, que sempre apoiam minhas idéias em prol a sociedade.

Ao professor e “camarada” Juliano por orientar em toda minha jornada de pós graduação.

A todos os coautores dos artigos e resumos publicados desta tese, em especial a Leandro Ploêncio e Rodrigo Hoff.

Agradeço aos envolvidos de forma indireta (contribuintes) na execução deste projeto de pesquisa, retornando o investimento em prol da segurança dos alimentos e da saúde pública.

Por fim, agradeço às dificuldades e aos problemas que a vida adulta nos proporciona. Agradeço às mais de 20 horas semanais de trânsito entre o caminho de casa ao trabalho e/ou universidade que proporcionaram ocupar minha mente com a ideia e elaboração do capítulo V; as dezenas de horas fazendo meu filho Antonio dormir, já que é uma das principais coisas que um recém-nascido necessita fazer, proporcionando através do silêncio a ideia e construção do capítulo II; aos mais de 10 km rodados de carrinho de bebê que proporcionaram a leitura através do celular de mais de 100 artigos utilizados na revisão desta tese; a falta de dinheiro e a alta do dólar, fazendo com que nossa família não tivesse longas viagens de férias como de costume, dando oportunidade para a elaboração e publicação do capítulo I ; aos inúmeros finais de semana de mar “flat” que proporcionaram o capricho e a inovação química desta tese; entre outras diversas dificuldades transformadas em trabalho, aprendizado e satisfação.

Obrigado a todos!

Num nicho dividido entre a adoração a um Deus falido e a imposição a um Deus particular, prevalece o desejo de eliminar a diferença de pensamentos, com o impacto das informações baseadas no número de seguidores virtuais em vez da credibilidade rastreável, uma ilusão sobre a real e verdadeira construção de cidadania.

Próprio autor

“The world is a dangerous place to live; not because of the people who are evil, but because of the people who don't do anything about it”

Albert Einstein

RESUMO

O câncer é a segunda maior causa de morte humana na atualidade. É considerada uma doença multifatorial, podendo estar associado a fatores ambientais como a dieta. Esta tese, composta por cinco capítulos, teve como principal objetivo elucidar a formação dos mutagênicos 2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP) e do ácido etilnitrólico (ENA) na reação entre conservantes utilizados no processamento de carnes. Para isso, diversas ferramentas analíticas e modelos estatísticos foram desenvolvidos com êxito proporcionando inovação química a esse cenário. Os resultados obtidos corroboram a decisão da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) de classificar as carnes processadas como cancerígenas para humanos. Mais de 100 amostras comerciais foram analisadas e 38% continham adição irregular de nitrito e sorbato. Além da utilização excessiva de conservantes, ENA ($> 5,00 \mu\text{g kg}^{-1}$) e DNMP ($> 12,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) foram detectados em amostras de mortadela, bacon, linguiça calabresa e patê. Além disso, mortadelas produzidas em escala piloto com 0,3% de nitrito e 0,034% de sorbato, sem eritorbato de sódio, apresentaram altas concentrações de ENA e DNMP. Esses resultados alertam sobre um grande problema de saúde pública, demandando incremento da fiscalização e Ciência dos Alimentos para sua resolução. Dessa forma, o micro-organismo *Lactobacillus bulgaricus* (LB-UFSC 001) foi empregado em um tratamento experimental para que, através da fermentação, pudesse biodegradar ENA e DNMP na mortadela fabricada em escala piloto. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) das concentrações de ENA e DNMP nas mortadelas antes e após o tratamento. A identificação dos principais metabólitos contribuiu para a elucidação das principais rotas metabólicas, demonstrando que LB-UFSC 001 utiliza-se de nitrorredutases e hidratases nitrílicas para modular os compostos mutagênicos na matriz cárnea. Esta tese demonstrou que compreender os mecanismos envolvidos na formação e inibição de carcinógenos, bem como a composição química e microbiológica da matriz, pode fornecer evidências mais claras sobre as classificações de risco de câncer atribuídas mundialmente ao consumo de carnes processadas.

Palavras-chave: Câncer. Saúde pública. Ácido sórbico. Nitrito. Produtos cárneos. Bactérias ácido lácticas. Segurança alimentar. Metrologia química.

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of human death today. It is considered a multifactorial disease and may be associated with environmental factors such as diet. This thesis, composed of five chapters, aimed to elucidate the formation of mutagens 2-methyl-1,4-dinitro-pyrrol (DNMP) and ethyl nitrolic acid (ENA) in the reaction between preservatives used in meat processing. For this, several analytical tools and statistical models have been successfully developed providing chemical innovation to this scenario. The results corroborate the decision of the International Agency for Research on Cancer (IARC) to classify processed meats as carcinogenic to humans. More than 100 commercial samples were analyzed and 38% contained irregular addition of nitrite and sorbate. In addition to non-compliant preservatives, ENA ($> 5.00 \mu\text{g kg}^{-1}$) and DNMP ($> 12.0 \mu\text{g kg}^{-1}$) were detected in samples of mortadella, bacon, pepperoni, and pâté. Moreover, high concentrations of ENA and DNMP were quantitated in mortadella produced on a pilot scale with 0.3% nitrite and 0.034% sorbate without sodium erythorbate. These results warn of a major public health problem, demanding the improvement of official inspection and food science for its resolution. Thus, the microorganism *Lactobacillus bulgaricus* (LB-UFSC 001) was used in an experimental treatment to biodegrade ENA and DNMP by fermentating mortadella samples produced in pilot scale. There was a significant difference ($p < 0.05$) in ENA and DNMP concentrations in the mortadellas before and after treatment. The identification of the main metabolites contributed to the elucidation of the main metabolic pathways, demonstrating that LB-UFSC 001 uses nitro reductases and nitrile hydratases to modulate mutagenic compounds in the meat matrix. This thesis has shown that understanding the mechanisms involved in carcinogen formation and inhibition, as well as the chemical and microbiological composition of the matrix, can provide clearer evidence on the cancer risk ratings attributed to the consumption of processed meats worldwide.

Keywords: Cancer. Public health. Sorbic acid. Nitrite. Meat products. Lactic acid bacteria. Food safety. Chemical metrology.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1– Parte A: Interação entre o sorbato de potássio (1) e o nitrito de sódio (2), sob condições experimentais específicas formando espécies químicas como o 2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP) (3) e o ácido etilnitrólico (ENA) (4). Parte B: decomposição do DNMP e ENA produzindo espécies químicas reativas com potencial mutagênico, como os isômeros estruturais (5.1, 5.2, 5.3), 5-metil-3-nitro-1H-pirrol-2 (5H) -ona (6), óxido de acetonitrila (8), entre outros intermediários (4.1 e 7). 19
- Figura 2– Reações (parte A) e estruturas químicas (parte B) das principais nitrosaminas detectadas em produtos cárneos. 23

Capítulo II

- Figura 1 – Estruturas químicas: ácido sórbico (SOR), ácido benzóico (BEN), hexametilenotetramina (HMT), natamicina (NAT), nisina (NIS), ácido cítrico (CTA), ácido láctico (LCA), metilparabeno (MtP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP), butilparabeno (BuP), cadaverina (CAD), histamina (HIS), putrescina (PUT), espermidina (SPD), espermina (SP), tiramina (TIR), 1,3-diaminopropano (1,3-DMP), e 3,5-ácido dinitrobenzóico (3,5-DNB). 72
- Figura 2 – Cromatograma obtido por LC-MS/MS em amostra branca fortificada. Em modo positivo no cromatograma acima: 2,79 min 1,3-diaminopropano, putrescina, cadaverina e histamina; 2,95 min espermidina e espermina; 3,05 min hexametilenotetramina; 3,23 min, tiramina; 3,43 min ácido cítrico; 5,65 min ácido sórbico; 5,85 min ácido benzóico; 6,41 min nisina e 7,62 min natamicina. Em modo negativo no cromatograma abaixo: 3,41 min ácido láctico; 6,28 min metilparabeno; 6,99 min ácido 3,5-dinitrobenzóico; 7,31 min etilparabeno; 8,08 min propilparabeno e 8,48 min butilparabeno. 74
- Figura 3– Cromatogramas obtidos durante avaliação da seletividade. Na esquerda, cromatogramas de amostras brancas; no lado direito, cromatogramas de amostras brancas fortificadas com os analitos. C = produto cárneo cozido; D = produto cárneo fermentado; M = carnes in natura; F = pescado. A letra f representa o processo de fortificação das amostras. 78
- Figura 4– Gráficos (concentração em mg kg⁻¹ versus dias) para o teste de estabilidade dos extratos (A, B) e gráficos de controle (C, D) da variabilidade do parâmetro. Analitos: ácido sórbico (SOR), ácido benzóico (BEN), hexametilenotetramina (HMT), natamicina

(NAT), nisina (NIS), ácido cítrico (CTA), ácido láctico (LCA), metilparabeno (MtP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP), butilparabeno (BuP) e aminas biogênicas (BAs).....	82
Figura 5– Valores das incertezas padrão de saída ($u(y_i)$) estimadas e suas contribuições percentuais para o modelo de medição global.....	85

Capítulo III

Figura 1– Caracterização do DNMP por LC-MS/MS, em que A: cromatograma em fase reversa em cianopropil como fase estacionária e B: fragmentação do DNMP de massa exata $171,0 \text{ g mol}^{-1}$, íon precursor $172,0 \text{ Da}$, fragmento $126,0 \text{ Da}$, em Da (perda de NO_2), $109,0 \text{ Da}$, em Da (perda de NO_2 , CH_3), e $62,0 \text{ Da}$, em Da (perda de NO_2 , NO_2 , CH_3).	111
Figura 2 – Padrão de fragmentação do ácido etilnitrólico (ENA) por espectrometria de massas, íon precursor $103,0 \text{ Da}$, fragmento íon nitrito (NO_2^-) de $46,0 \text{ Da}$; íon fulminato (CNO^-) de $43,0 \text{ Da}$; e íon etenamida ($\text{C}_2\text{H}_2\text{N}^-$) de $41,2 \text{ Da}$	111
Figura 3– Estimativa dos contrastes das variáveis de extração selecionadas durante o procedimento analítico.	112
Figura 4– Resultados da segunda etapa de avaliação das técnicas de extração, com base na incerteza de medição, efeito de matriz, intensidade do sinal analítico e limpeza do extrato final com base em valores médios.....	115
Figura 5– Resultados da etapa final (otimização) das técnicas de extração, com base na intensidade do sinal analítico e incerteza de medição.	117
Figura 6– Parâmetros de diferentes modos de cromatografia líquida para a análise do ácido nítrico etílico (ENA): intensidade máxima do sinal (em cps), variabilidade aleatória e tempo de retenção (em minutos) pelas fases estacionárias.	120
Figura 7– Cromatograma dos analitos ácido etilnitrólico (ENA), 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP), do padrão interno N-nitrosopirrolidina-d4 (NPYR-d4) e dos interferentes isobáricos (II-n).	121
Figura 8– Comparação dos modelos de calibração (em matriz branca e por adição de padrão) realizados para a quantificação do ácido etilnitrólico (ENA) e do 2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP) com as amostras de mortadela branca (Ref) produzidas in house, peperoni (V), salame 1 (U), salame 2 (Q), presunto cozido (G), hambúrguer (D), nuggets de frango (F), mortadela de frango (A), salsicha (B), calabresa (E) e patê cárneo (Y). Íons de fragmentação: ENA 1 = $46,0 \text{ Da}$, ENA 2 = $43,0 \text{ Da}$, ENA 3 = $41,0 \text{ Da}$, DNMP 1 = $126,0 \text{ Da}$, DNMP 2 = $110,0 \text{ Da}$, DNMP 3 = $126,0 \text{ Da}$	123

Figura 9– Contribuições das incertezas padrão de saída e dos erros no modelo de medição global	125
--	-----

Capítulo IV

Figura 1– Fluxograma das principais etapas do processamento utilizados na elaboração do produto cárneo tipo mortadela	138
Figura 2– Esquema sobre a bioconversão das espécies mutagênicas ácido etilnitroso (ENA) e do 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP) por cepas selvagens de <i>L. bulgaricus</i> e as principais rotas e produtos reacionais formados. Onde NMAP: 1-nitro-2-metil-3-amino pirrol, ACNO: óxido de acetonitrila e ACH: ácido acetohidroxâmico.	146
Figura 3– Gráfico da concentração dos mutagênicos ácido etilnitroso (ENA) e do 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP) em $\mu\text{g L}^{-1}$ versus intensidade de sinal dos metalólitos (em %), óxido de acetonitrila (ACNO), ácido acetohidroxâmico (ACH), 1-nitro-2-metil-3-amino pirrol (NMAP), 3-amino pirrol (MPYR) e o somatório dos íons nitrito e nitrato ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$), em reações <i>in vitro</i> com <i>L. bulgaricus</i>	147
Figura 4– Estudo cinético da biodegradação do ácido etilnitroso (ENA) e do 2-metil-1,4-dinitropirrole (DNMP) em mortadela após o tratamento com <i>L. bulgaricus</i> . Gráfico da intensidade de sinal (em %) do ENA, DNMP, óxido de acetonitrila (ACNO), ácido acetohidroxâmico (ACH), 1-nitro-2-metil-3-amino pyrrole (NMAP), 3-amino pyrrole (MPYR) versus tempo de fermentação em minutos.....	149
Figura 5– Resultados da formação e biodegradação dos compostos mutagênicos ácido etilnitroso (ENA) e do 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP) em mortadelas produzidas sob diferentes proporções de conservantes e antioxidantes. Parte A: formação dos compostos após os diferentes processamentos (A, B, C e D) antes e depois do tratamento com culturas selvagens de <i>L. bulgaricus</i> . Parte B: gráfico do erro normalizado (En) demonstrando a diferença das abrangencia da parte A após o tratamento com <i>L. bulgaricus</i>	153

Capítulo V

Figura 1– Design experimental para estimativa da incerteza de medição do ensaio qualitativo de sulfito em alimentos..... 171

Figura 2 – Gráfico teórico dos diferentes perfis de incertezas obtidos a partir de medidas químicas laboratoriais, desde suas avaliações de desempenho inicial até infinitos números de medidas em rotina laboratorial sob condições de precisão intermediária. 177

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1– Principais dados e evidências sobre os compostos tóxicos formados na interação entre conservantes e processamento de carnes.	14
---	----

Capítulo II

Tabela 1 – Parâmetros de otimização nos quadropolos através do monitoramento múltiplo de reações de analito.	76
Tabela 2 – Resultados dos parâmetros de linearidade e limites analíticos.	79
Tabela 3 – Valores das principais fontes de incertezas padrão obtidas em procedimentos analíticos após a aplicação da modelagem matemática para as estimativas.	84
Tabela 4 – Resultados da aplicabilidade do método em análises de rotina.	87

Capítulo III

Tabela 1– Delineamento experimentais utilizando fase sólida na extração dos analitos.	104
Tabela 2– Parâmetros otimizados no espectrômetro de massas.	119
Tabela 3– Parâmetros dos critérios de desempenho do método.	122

Capítulo IV

Tabela 1 – Abordagens analíticas utilizadas durante o estudo sobre a biodegradação do 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP) e ácido etilnitrólico (ENA) por cepas selvagens de <i>L. bulgaricus</i>	140
--	-----

Capítulo V

Tabela 1– Resultados dos parâmetros de validação do método quantitativo de sulfito em alimentos por volumetria.	172
Tabela 2– Resultados da avaliação de precisão do método de sulfito qualitativo por reação de verde malaquita.	173
Tabela 3 – Resultados das incertezas de medição do método quantitativo de sulfito através de diferentes abordagens de estimativa.	175

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I - INTERAÇÕES DE CONSERVANTES NO PROCESSAMENTO DE CARNES: FORMAÇÃO DE COMPOSTOS CARCINOGENICOS, MÉTODOS DE CONTROLE E AGENTES INIBITÓRIOS	5
APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 INTERAÇÕES ENTRE O NITRITO E SORBATO	12
3 INTERAÇÕES ENTRE CONSERVANTES, MATRIZES CARNEAS E PROCESSAMENTO.....	21
3.1 Nitrosaminas	21
3.2 Compostos induzidos pelo processamento e degradação de aditivos	25
3.2.1 N-alkyl-imidazol	25
3.2.2 Azodicarbonamida.....	26
4 PRODUTOS DA INTERAÇÃO ENTRE TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO E MATRIZ CÁRNEA	28
4.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	28
4.2 Aminas heterocíclicas aromáticas	30
4.3 Acrilamida	31
5 MÉTODOS ANALITICOS ATUAIS DE CONTROLE	32
6 INIBIÇÃO DE COMPOSTOS CARCINOGENICOS EM	35
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	38
REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO II - UMA FERRAMENTA MULTIPROPÓSITO PARA A INSPEÇÃO DE ALIMENTOS: DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CONSERVANTES E AMINAS BIOGENICAS EM CARNES, PEIXES E DERIVADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTOMETRIA DE MASSAS	56

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	57
RESUMO	58
ABSTRACT	59
1 INTRODUÇÃO.....	60
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1 Padrões e reagentes	62
2.2 Amostras e brancos analíticos	63
2.3 Preparo das amostras	64
2.4 Método de extração	64
2.5 Análises por LC-MS/MS	64
2.6 Validação analítica	65
2.7 Incerteza de medição	68
2.8 Expressão dos resultados	70
2.9 Aplicabilidade do método	70
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1 Método de extração	70
3.2 Análises por LC-MS/MS	71
3.3 Validação do método	77
3.4 Incerteza de medição global da ferramenta de medição	83
3.5 Aplicabilidade do método	85
4 CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS	90
CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DOS MUTAGÊNICOS ÁCIDO ETILNITRÓLICO E 2-METIL-1,4-DINITRO PIRROL EM PRODUTOS CÁRNEOS: ABORDAGENS DE SÍNTESE, EXTRAÇÃO E ANÁLISE SIMULTÂNEA POR LC-MS/MS	94
APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	95
ABSTRACT	97
1 INTRODUÇÃO.....	98

2 MATERIAL E MÉTODOS.....	99
2.1 Padrões comerciais e reagentes	99
2.2 Síntese dos mutagênicos	100
2.3 Amostras utilizadas no desenvolvimento, validação e aplicabilidade do método	102
2.4 Abordagens experimentais de extração.....	102
2.5 ABORDAGENS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	106
2.6 Quantificação do nitrito, nitrato e ácido sórbico	107
2.7 Validação do método	107
2.8 Estimativa da incerteza global	109
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
3.1 Síntese dos compostos e caracterização	110
3.2 Método de extração	112
3.3 Abordagens de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	117
3.4 Validação analítica	120
3.5 Aplicabilidade do método	122
3.6 Erros e incertezas do método.....	124
3.7 Resultados das amostras	125
4 CONCLUSÃO.....	126
REFERÊNCIAS	127
CAPÍTULO IV - BIOTRANSFORMAÇÃO MICROBIANA DE COMPOSTOS MUTAGÊNICOS TIPO N-NITRO, C-NITRO E C-NITROSO EM PRODUTOS CÁRNEOS POR <i>LACTOBACILLUS DELBRUECKII</i> SUBSP. <i>BULGARICUS</i>..	130
APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	131
RESUMO.....	132
ABSTRACT	133
1 INTRODUÇÃO.....	134
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	136

2.1 Reagentes e padrões analíticos	136
2.2 Micro-organismos	137
2.3 Produção das amostras	137
2.4 Instrumentação analítica	138
2.5 Abordagens analíticas experimentais	139
2.6 Identificação de metabólitos e marcadores reacionais	141
2.7 Incubação do <i>L. bulgaricus</i> com compostos mutagênicos	141
2.8 Critério de aceitabilidade das medidas e modelos estatísticos	142
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	143
3.1 Biotransformação dos compostos mutagênicos por <i>L. bulgaricus</i> e os metabolitos gerados	143
3.2 Processamento cárneo versus formação de compostos mutagênicos	147
3.3 Ação desmutagênica do <i>L. bulgaricus</i>	151
3.4 Confiabilidade do estudo: incertezas teóricas e experimentais	154
4 CONCLUSÃO	155
REFERÊNCIAS	157
 CAPÍTULO V - INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO EM ABORDAGENS EXPERIMENTAIS PARA ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO EM ANÁLISES DE CONSERVANTES EM ALIMENTOS.	
	161
APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	162
RESUMO	163
ABSTRACT	164
1 INTRODUÇÃO	165
2 MATERIAL E MÉTODOS	166
2.1 Amostras, reagentes e padrões	166
2.2 Procedimentos analíticos	167
2.3 Confirmação de desempenho dos métodos analíticos	167
2.3.1 Método quantitativo	167

2.3.2 Método qualitativo.....	168
2.4 Estimativa da incerteza de medição.....	168
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	172
4 CONCLUSÃO.....	178
REFERÊNCIAS	179
CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	181
REFERÊNCIAS	183
APÊNDICE A – Síntese dos mutagênicos	186
APÊNDICE B – Modelagem matemática para a estimativa de incertezas de medição	190
APÊNDICE C – Publicações	192

INTRODUÇÃO

A deterioração dos alimentos deve-se a uma vasta gama de reações, destacando-se as de origem microbiológica. Além de perdas econômicas para a indústria, microorganismos patogênicos podem contaminar os alimentos e gerar danos à saúde dos consumidores. O uso de conservantes é uma das principais estratégias utilizadas pela indústria de alimentos na ação antimicrobiana (RAJKOVIC; SMIGIC; DEVLIEGHIERE, 2010). Entretanto, o uso irresponsável de conservantes pode estar entre os principais perigos químicos presentes nos produtos alimentares (MOLOGNONI et al., 2018a). Devido a constantes escândalos que assolam a indústria e opinião pública, o uso irregular de aditivos alimentares está entre as principais preocupações dos consumidores nos últimos anos (SHIM et al., 2011; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018; ABBAS et al., 2018).

Estudos recentes demonstram que o uso abusivo de conservantes em produtos de origem animal é ainda uma prática atual, e requer atenção em determinadas localidades do mundo (MOLOGNONI et al., 2016a; MOLOGNONI et al., 2016b; SANTOS et al., 2016; MOLOGNONI et al., 2018a; MOLOGNONI et al., 2018b; ZHANG et al., 2018). Além do consumo excessivo dessas substâncias, os consumidores podem estar expostos a produtos de maior potencial tóxico, como os provenientes de reações entre conservantes de alimentos (MOLOGNONI et al., 2018b; HERRAIZ; GALISTEO, 2018). Além disso, ações antropogênicas correlacionadas ao uso indevido de conservantes podem impactar o meio ambiente de forma negativa (WANG; KANNAN 2016; KIM et al., 2018).

Nos anos 80, os efeitos sinérgicos de conservantes na conservação de produtos cárneos foram investigados. Vantagens como a extensão da vida de prateleira, inibição de patógenos (por exemplo, *Clostridium botulinum*), redução na quantidade de sais de cura e inibição da microbiota deteriorante em produtos fermentados foram revelados (ROBACH; STATELER, 1980; ROBACH, SOFOS, 1982; SOFOS). No entanto, as reações entre certos conservantes resultaram na formação de compostos com propriedades mutagênicas do DNA (HAYATSU; CHUNG; NAKAJIMA, 1975; KITO; NAMIKI; TSUJI, 1978; NAMIKI et al., 1981; SCOTTER; CASTLE, 2014). A formação de compostos *N*-nitroso e *C*-nitroso foram os mais citados na literatura (ROBACH; STATELER, 1980; HERRMANN et al., 2015; HERRAIZ; GALISTEO, 2018).

Os carcinomas estão entre as doenças mais temidas pela população mundial. De fato, após as doenças cardiovasculares, são a principal causa de morte humana (WHO,

2018). Por envolver fatores genéticos e ambientais, o câncer tem sido considerado uma doença multifatorial. Dessa forma, o risco de desenvolver muitos tipos de carcinomas pode estar associado ao tipo de dieta do indivíduo (LATINO-MARTEL et al., 2016). Segundo a IARC (*International Agency for Research on Cancer*), há evidências suficientes para classificar o consumo de carnes processadas como carcinogênico para humanos. Entre os principais fatores que levaram a essa classificação, pode-se citar o processamento industrial e os aditivos alimentares (IARC, 2015). No entanto, a avaliação de risco é imprescindível para estabelecer quais são os compostos, mecanismos e a exposição que levam ao aumento da incidência ao câncer. Ainda existem muitas lacunas sobre as informações a respeito dos agentes carcinógenos, a influência do processamento industrial e da culinária no risco aumentado de cânceres. Poucos estudos estão disponíveis a respeito das reações entre os conservantes no processamento de produtos cárneos (EFSA, 2015; DOMINGO; NADAL, 2017).

O apoio laboratorial é, sem dúvida, imprescindível no que tange à segurança dos alimentos. Entretanto, a evolução dos métodos analíticos deve acompanhar o grau de sofisticação das adulterações e dos reais riscos à saúde dos consumidores, em decorrência do consumo de alimentos processados (MOLOGNONI et al., 2018a). A espectrometria de massas (MS) consiste de uma técnica sensível e versátil, proporcionando novas respostas para a resolução de problemas consolidados (YOSHIMURA et al., 2016; MOLOGNONI et al., 2016a). Hifenada à cromatografia líquida (LC-MS/MS), possibilita desenvolver ferramentas analíticas com caráter multipropósito. Isso facilita o apoio laboratorial à fiscalização de alimentos, uma vez que encurta o tempo de análise, reduz custo com a substituição de diversos métodos e proporcionam uma vasta gama de informações. Geralmente, é aplicada a mais de um composto/matriz com características físico-químicas distintas, mas que fazem parte do mesmo problema e/ou risco associado ao consumidor.

Estudos relatam que os componentes alimentares e as modificações no processamento podem modular compostos carcinogênicos em alimentos ou sistemas vivos. Embora os mecanismos ainda não sejam totalmente elucidados, a ação desmutagênica por propriedades antioxidantes de fenólicos e ácidos orgânicos (VITAGLIONE; FOGLIANO, 2004), conversão por enzimas específicas produzidas pelas células (FUCHS et al., 2008), adsorção à parede celular de micro-organismos (HASKARD, BINNION, AHOKAS, 2000), redução enzimática (DE OLIVEIRA; BONATTO; HENRIQUES, 2010), entre outros, vêm sendo relatados. As bactérias ácido

láticas (BAL) têm sido muito estudadas na biorremediação de nitro compostos na área ambiental (DE OLIVEIRA; BONATTO; HENRIQUES, 2010; SERRANO-GONZÁLEZ et al., 2018). No entanto, o uso de BAL na bioconversão e inibição de compostos tóxicos nos alimentos ainda foi pouco explorado. A biodisponibilidade, os efeitos interativos e os fatores que determinam as atividades dos micro-organismos na ação desmutagênica devem ser estudados, podendo contribuir para a garantia da inocuidade dos alimentos.

Nesse contexto, esta tese permitiu o desenvolvimento de novas ferramentas analíticas para o controle de alimentos, visando obter base e confiabilidade nos estudos relacionados à formação, quantificação e inibição de compostos carcinogênicos formados durante interações de conservantes no processamento de carnes. O desenvolvimento de técnicas de bioconversão de carcinógenos e mudanças nas atuais condições do processamento cárneo podem ser a chave para a resolução de problemas de saúde pública, representando a importância e o estado da arte desta tese de doutorado. Dessa forma, este trabalho está dividido em:

Capítulo I: **Revisão da literatura**, que aborda as principais problemáticas e temas envolvidos no estudo, como os compostos tóxicos formados na interação entre conservantes e processamento industrial carnes, método analíticos de controle e agentes inibitórios desses compostos.

Capítulo II: **Uma ferramenta multipropósito para a inspeção de carnes, pescados e derivados**, cujo objetivo foi desenvolver um método para determinação simultânea de diversas classes de amins biogênicas e conservantes por LC-MS/MS.

Capítulo III: **Avaliação dos mutagênicos ácido etilnitroso e 2-metil-1,4-dinitro pirrol em produtos cárneos**, cujo objetivo foi desenvolver métodos para a extração e determinação simultânea dos mutagênicos 1,4-dinitro-2-metilpirrole (DNMP) e ácido etilnitroso (ENA) por LC-MS/MS.

Capítulo IV: **Biotransformação microbiana de compostos mutagênicos do tipo N-nitro, C-nitro e C-nitroso em produtos cárneos por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus***, cujo objetivo foi utilizar culturas selvagens de *L. bulgaricus* para biodegradar ENA e DNMP em mortadela submetida a diferentes condições experimentais de processamento. Um estudo analítico sobre a formação e estabilidade dos compostos de degradação do tipo N-nitro-, C-nitro- e C-nitroso foi empregado.

Capítulo V: **Influência dos parâmetros de desempenho analítico em abordagens experimentais para a estimativa da incerteza de medição em análises de conservantes em alimentos**, cujo objetivo foi demonstrar a influência que as incertezas

aleatórias obtidas em procedimentos de confirmação de desempenho de métodos analíticos, têm nas abordagens empíricas de estimativa de incerteza de medição de ensaios químicos quantitativos e qualitativos para análise de conservantes em alimentos.

Os artigos publicados em revistas indexadas referentes aos capítulos estão disponíveis no apêndice desta tese.

CAPÍTULO I - INTERAÇÕES DE CONSERVANTES NO PROCESSAMENTO DE CARNES: FORMAÇÃO DE COMPOSTOS CARCINOGENICOS, MÉTODOS DE CONTROLE E AGENTES INIBITÓRIOS

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

No presente capítulo é apresentado um artigo de revisão. Ele aborda informações a respeito da formação, toxicidade, controle analítico e métodos de inibição de alguns compostos carcinogênicos formados durante a interação entre conservantes no processamento de carnes. De acordo com os dados da literatura, existem evidências suficientes para considerar o consumo de carnes processadas como cancerígeno para humanos. Entretanto, poucos estudos sobre a formação de compostos carcinogênicos a partir de reações entre de conservantes estão disponíveis. Compreender os mecanismos envolvidos em tais processos pode fornecer evidências mais claras sobre os riscos aumentados de desenvolver alguns tipos de carcinomas a partir do consumo de carnes processadas. As reações entre os conservantes nitrito de sódio com o sorbato de potássio foram os mais abordados e discutidos no capítulo, uma vez que são os principais objetos de estudo desta tese. Esta revisão foi publicada no periódico *Food Research International*.

Artigo publicado:

MOLOGNONI L. et al. Interactions of preservatives in meat processing: formation of carcinogenic compounds, analytical methods, and inhibitory agents. *Food Research International*, v. 125, 108608, 2019. Doi: 10.1016/j.foodres.2019.108608.

RESUMO

Os produtos cárneos são utilizados em dietas devido à sua riqueza nutricional. No entanto, compostos tóxicos podem ser formados durante o processamento, provenientes de interações entre os componentes alimentares, conservantes e condições específicas de processos industriais. Os compostos *N*-nitroso, aminas aromáticas heterocíclicas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, 1,4-dinitro-2-metilpirrole (DNMP) e ácido etilnitroso (ENA) estão entre os principais compostos de interesse toxicológico. As evidências apresentadas nesta revisão corroboram a decisão da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), de classificar o consumo de carnes processadas como carcinogênico para humanos. Este artigo também visou esclarecer como esses compostos são formados, assim como seus possíveis efeitos tóxicos em humanos. Foi demonstrado que o abuso de conservantes e outros aditivos proibidos contribuem na formação de compostos cancerígenos em produtos cárneos. Por outro lado, a formação desses compostos não se deve apenas ao uso de aditivos, uma vez que podem ser formados durante os processamentos ou na digestão, sem ligação clara a qualquer aditivo. Estabelecer limites residuais para os principais contaminantes formados durante o processamento de carnes é fundamental, como para o DNMP e ENA. O escopo dos contaminantes monitorados em programas de segurança alimentar deve ser estendido para poder avaliar-se os reais riscos ao uso inadequado de aditivos alimentares. Dessa forma, métodos analíticos modernos e confiáveis para a análise de compostos carcinogênicos em produtos cárneos devem estar disponíveis. Por outro lado, o uso de processos fermentativos e enzimáticos na bioconversão de compostos tóxicos em alimentos tem sido reportados. O uso de antioxidantes está entre as principais abordagens na inibição de compostos carcinogênicos em carnes processadas, devido ao baixo custo e eficácia. Dessa forma, a classificação da IARC deve considerar no futuro os diferentes tipos de produtos cárneos, bem como sua composição química e microbiológica. Estudos adicionais são necessários para esclarecer quais são os compostos e os mecanismos que levam ao risco aumentado de desenvolver carcinomas devido ao consumo de carnes processadas. Estudos adicionais sobre os agentes cancerígenos devem ser realizados, incluindo suas implicações na saúde em relação ao consumo de outros alimentos.

Palavras-chave: Processamento de alimentos. Aminas aromáticas heterocíclicas. Produtos cárneos. Compostos *N*-nitroso. Nitro compostos. Hidrocarbonetos aromáticos heterocíclicos.

ABSTRACT

Meat products are important for balanced diets because of their nutritional richness. However, noxious compounds may be formed by interactions among reactants and specific conditions in processed meats. *N*-nitroso compounds, heterocyclic aromatic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons, 1, 4-dinitro-2-methyl pyrrole (DNMP), and ethyl nitrolic acid (ENA) are among the main compounds of toxicological concern. This review corroborates the International Agency for Research on Cancer's decision to classify those foodstuffs as carcinogenic to humans. Furthermore, this paper also aimed at clarifying how noxious compounds are formed in meat products, as well as their health effects for consumers. The preservatives abuse and the use of forbidden additives may increase the formation of carcinogens. Risks are not only due to preservatives, since some compounds are formed during processing or digestion, without clear link to any additive. Regulation should set specific residue limits for other noxious compounds in meat products, such as DNMP and ENA. The scope of control programs should be extended instead of assessing the proper use of additives only. Thus, reliable analytical methods for the quantitation of carcinogens should be available. Fermentative and enzymatic processes for bioconversion are among the main strategies to solve these problems in foodstuffs. The use of antioxidants is the most common approach, because of its low cost and effectiveness. In the future, the IARC classification should rather consider different categories of processing, as well as the chemical and microbiological composition of meat products. Further studies are still required to clarify the increase on cancer risk due to the consumption of meat products and to elucidate the main mechanisms of carcinogenicity. Notwithstanding, such carcinogens cannot be neglected, but continuously investigated, including their health implications in relation to other foods.

Keywords: Food processing. Heterocyclic aromatic amines. Meat products. *N*-nitroso compounds. Noxious compounds. Polycyclic aromatic hydrocarbons.

1 INTRODUÇÃO

Durante séculos a carne tem sido uma importante fonte de proteína para os seres humanos, fornecendo-lhes também vitaminas (especialmente do complexo B) e minerais como ferro e zinco (PEREIRA; VICENTE, 2013). Devido à sua rica composição nutricional, a deterioração pode ocorrer por uma vasta gama de reações, destacando-se as de origem química e microbiológica. Historicamente, a necessidade de armazenar e transportar carnes levou ao desenvolvimento de técnicas de processamento que aumentaram seu poder de conservação. Desde o final do século XIX, a indústria de carnes se desenvolveu expressivamente servindo de modelo para outros processos industriais de escala produtiva em série (FOER, 2011).

A possível presença de compostos nocivos à saúde dos consumidores como *N*-nitroso (NOCs), aminas aromáticas heterocíclicas (HAA) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), levou a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) em 2015, a classificar o consumo de carnes processadas como “Grupo 1 - carcinogênico para humanos”. Essa classificação foi baseada em evidências suficientes de que o consumo de carnes processadas pode levar a incidência de câncer colorretal. Utilizando metanálise foram avaliados mais de 800 estudos epidemiológicos em todo o mundo. No entanto, a falta de estudos sobre os compostos tóxicos gerados na interação entre conservantes de alimentos é escassa (IARC, 2015).

Os principais mecanismos toxicológicos atribuídos aos produtos cárneos incluem a indução de mutações no DNA ocasionado por HAA e PAHs, ou por aldeídos citotóxicos e genotóxicos produzidos pelo grupo heme (responsável pela cor vermelha da carne), através da peroxidação lipídica e formação endógena de NOCs (CASCELLA et al., 2018). No entanto, é necessário se conhecer quais são os compostos específicos envolvidos nessas reações, os mecanismos de carcinogenicidade e a influência do processamento industrial e da culinária. Além disso, a interação entre conservantes utilizados em formulações de produtos cárneos na formação de compostos tóxicos deve ser investigado (WHO, 2006a; DOMINGO; NADAL, 2017; CASCELLA et al., 2018). Estratégias como a modificação de formulações, manipulação de matérias-primas e mudanças no processamento de produtos cárneos têm sido apresentadas como medidas preventivas à formação de compostos tóxicos (JIMÉNEZ-COLMENERO; CARBALLO; COFRADES, 2001).

A utilização de conservantes em produtos cárneos ajuda a evitar a multiplicação de micro-organismos indesejáveis, reduzindo perdas econômicas para a indústria devido à deterioração. Além disso, o crescimento de micro-organismos patogênicos representa um risco para a saúde dos consumidores. Dentre os conservantes mais utilizados destacam-se: nitrito, nitrato, ácidos orgânicos, sulfito, bacteriocinas, macrolídeos políenios, entre outros. Por outro lado, o uso irresponsável de conservantes pode estar entre os principais perigos químicos presentes nos produtos alimentares (MOLOGNONI et al., 2018b). Devido a constantes escândalos que assolam a indústria e opinião pública, o uso irregular de aditivos alimentares está entre as principais preocupações dos consumidores nos últimos tempos (SHIM et al., 2011; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018; ABBAS et al., 2018).

A descoberta de efeitos sinérgicos de substâncias com propriedades antimicrobianas constitui de grandes achados, até mesmo patenteáveis (LAMBERT et al., 2003; SHI et al., 2017). Alguns efeitos sinérgicos de conservantes no processamento de carnes apresentaram vantagens como o aumento na vida de prateleira dos produtos, inibição do crescimento de patógenos como *Clostridium botulinum*, inibição da microbiota deteriorante em carnes fermentadas, redução na quantidade de sais de cura, entre outras vantagens (ROBACH; STATELER, 1980; ROBACH; SOFOS, 1982; SOFOS, 1985; ZAMORA, ZARITZKY, 1987; DROSINOS et al., 2006). No entanto, algumas dessas reações geraram compostos nocivos à saúde dos consumidores. A formação de compostos tipo C-nitro, C-nitroso e N-nitro com propriedades mutagênicas do DNA foi revelado (HAYATSU; CHUNG; NAKAJIMA, 1975; KITO, NAMIKI, TSUJI, 1978; NAMIKI et al., 1980; NAMIKI et al., 1981; BINSTOK et al., 1998; PÉREZ-PRIOR et al., 2008; MOLOGNONI et al., 2018a).

Por outro lado, o processamento de carnes através da salga, tratamento térmico, fermentação e defumação promovem alterações sensoriais, reações bioquímicas e bacteriológicas que resultam em melhorias do sabor, palatabilidade, digestibilidade e aceitação comercial (AUGUSTIN et al., 2016). Embora não sejam aplicados exclusivamente visando a conservação dos alimentos, há séculos são formas reconhecidas de evitar a ascensão de micro-organismos mesmo sem o emprego de conservantes (FASANO et al., 2016). No entanto, o uso de conservantes aliado a alguns desses processos pode induzir a formação de compostos tóxicos. NOCs podem ser formados a partir de reações entre o óxido de nitrogênio proveniente de sais de cura (nitrito) com

aminas de baixa massa molar provenientes das matrizes cárneas (HERRMANN et al., 2015; SINGH; VARSHNEY; AGARWAL, 2016; HERRAIZ; GALISTEO, 2018).

A aplicação de métodos analíticos modernos demonstrou que em alguns países o uso abusivo de conservantes no processamento de carnes ainda constitui-se uma prática atual. (MOLOGNONI et al., 2018a; MOLOGNONI et al., 2018b; ZHANG et al., 2018). Além do consumo excessivo de conservantes, os consumidores podem estar expostos a outros produtos reacionais de maior potencial toxicológico (HERRMANN et al., 2015; MOLOGNONI et al., 2018a; HERRAIZ; GALISTEO, 2018). Ações antropogênicas correlacionadas ao uso abusivo de conservantes também podem afetar o meio ambiente, devido à contaminação do solo e das águas residuais (WANG; KANNAN, 2016; KIM et al., 2018). Dessa forma, uma atualização contínua das ferramentas de controle é necessária para garantir a segurança alimentar e proporcionar o monitoramento adequado da qualidade desses alimentos.

Nos últimos anos, o número de resultados de pesquisa para os termos "carne processada" e "compostos cancerígenos" tem aumentado continuamente, com publicações já agendadas para 2021, provando que esse é um assunto de grande preocupação científica. Ao considerar algumas palavras-chave mencionadas nesta revisão, mais de 10.000 resultados foram alcançados para "produtos cárneos e conservantes" e mais de 160.000 resultados para "produtos cárneos" foram obtidos na plataforma Science Direct (Elsevier). Quando grupos específicos de compostos cancerígenos foram relacionados a produtos cárneos, essa mesma plataforma apresentou de 2.000 a 3.000 resultados, demonstrando que um estudo abrangente sobre esse assunto é uma tarefa bastante difícil e com devida importância.

Nesse contexto, considerando as preocupações com o consumo de carne processada e o abuso de conservantes, principalmente após publicações recentes da IARC, que considerou o consumo de carne processada como carcinogênico para humanos, este capítulo teve por objetivo contribuir para a compreensão de questões importantes e comuns de pesquisadores. Dessa forma, precisam ser esclarecidos questionamentos levantados no passado e seu desenrolar nos dias atuais, tais como: Quais e como são formados os compostos carcinogênicos provenientes de reações entre conservantes, conservantes-matriz alimentar e processamento-matriz alimentar em produtos cárneos? Quais são os possíveis efeitos para a saúde dos consumidores? Existem níveis aceitáveis de ingestão para esses compostos? Quais são os métodos analíticos aplicados no monitoramento desses compostos? E, finalmente, quais são as estratégias

dos produtores e das pesquisas recentes sobre a resolução para esses problemas? Existem agentes inibitórios para esses compostos?

2 INTERAÇÕES ENTRE O NITRITO E SORBATO

O nitrito de sódio (NaNO_2) é um conservante amplamente utilizado no processo de cura de carnes. Por outro lado, atua como um aditivo alimentar multifuncional, proporcionando atribuições sensoriais específicas, retardamento de reações catalíticas, propriedades antimicrobianas, entre outras funções desejáveis (WÓJCIAK; KARWOWSKA; DOLATOWSKI, 2014). Apesar de ser amplamente utilizado em produtos cárneos, a exposição humana ao nitrito vem principalmente do consumo de vegetais e água, ou na produção endógena através da via metabólica enterossalivar (GLADWIN et al., 2005; WEITZBERG; LUNDBERG, 2013). A alta reatividade do nitrito sob condições específicas de pH, temperatura e meio reacional, torna-o um agente nitrosante capaz de gerar compostos com potencial carcinogênico (MAGEE; BARNES, 1956; HERRAIZ; GALISTEO, 2018). Resultados promissores foram alcançados pela substituição total ou parcial de nitrito em produtos cárneos. Processos industriais alternativos, como a “cura natural” obtida a partir de extratos vegetais contendo nitrato juntamente a culturas *starter* para convertê-lo em nitrito, têm sido propostos para a substituição da cura tradicional (SEBRANEK et al., 2012). Culturas iniciadoras que convertem metamioglobina em nitrosomioglobina, pigmentos naturais, extratos vegetais, fibras, entre outros ingredientes, foram propostas como substituintes do íon nitrito (SEBRANEK et al., 2012). Apesar de todos os esforços, a combinação de características sensoriais marcantes nos produtos cárneos, efetiva ação contra patógenos (por exemplo, *Listeria monocytogenes* e *C. botulinum*) e baixo custo não consiste de uma tarefa simples. Nenhuma dessas propostas ainda foi considerada uma alternativa plausível na substituição dos nitritos pela indústria da carne, principalmente em termos de segurança alimentar.

O nitrito continua sendo considerado um ingrediente único e aparentemente insubstituível no processamento de carnes. Apesar de todas as controvérsias da segurança em torno a exposição humana ao nitrito na dieta, os produtos cárneos geralmente fornecem uma contribuição mínima para sua ingestão (SINDELAR; MILKOWSKI, 2012). Assim, o nitrito ainda é considerado seguro e, portanto, ainda é um aditivo amplamente empregado pelos processadores de carne.

Por outro lado, dietas ricas em nitrito podem até ser consideradas benéficas para a saúde por causa de seus efeitos hipotensores, antidiabéticos e antiobesidade (BUTLER, 2015; GHASEMI; JEDDI, 2017). Além disso, o nitrito pode desempenhar um papel protetor na saúde humana, pois atua como doador de óxido nítrico em condições de hipóxia. Além do efeito inibitório na oxidação lipídica, dependendo da sua concentração, o nitrito pode ter efeito anti ou pró-oxidante nas proteínas, despertando o interesse dos pesquisadores nesse aspecto (KRYCH-MADEJ; GEBICKA, 2017). Embora a comunidade científica tenha apresentado várias alternativas para a substituição do nitrito como conservante, ele ainda está enraizado em todo mundo e sua substituição ainda depende de mudanças culturais e econômicas.

Visando manter as características marcantes do nitrito sobre as carnes, a proposta de utilizá-lo em baixas concentrações com o emprego de outros conservantes foi incentivados no passado (SOFOS; BUSTA; ALLEN 1979). Para isso, foram requisitados conservantes com capacidade de inibir patógenos, que não apresentassem características sensoriais marcantes e que pudessem proporcionar a diminuição do nitrito, com o principal propósito de evitar a formação de nitrosaminas (ROBACH; STATELER 1980). Entretanto, a formação de compostos mutagênicos foram relatados por diferentes pesquisadores, provenientes da reação entre o nitrito de sódio e sorbato de potássio (Tabela 1) (HAYATSU; CHUNG; NAKAJIMA, 1975; KITO; NAMIKI; TSUJI, 1978; ANDREWS; FORNWALD; LIJINSKY, 1980; NAMIKI et al., 1981; BINSTOK et al., 1998; PÉREZ-PRIOR et al., 2008).

Tabela 1– Principais dados e evidências sobre os compostos tóxicos formados na interação entre conservantes e processamento de carnes.

<i>Continua</i>					
Composto (Número do CAS)	Como é formado?	Existe evidência de toxicidade?	Está estabelecido um índice de ingestão diária?	Existem limites regulatórios em carnes? E para outros alimentos?	Referências
Interações de conservantes					
Ácido etilnitroso (ENA) (600-26-0) 2-metil-1,4- dinitro pirrol (DNMP) (75142-42-6) 5-metil-3-nitro- 1H-pirrol-2(5H) - one (CAS não encontrado)	Reação entre nitrito e sorbato sob aquecimento	Genotoxicidade e mutagenicidade positiva em <i>rec- assay</i> com <i>Bacillus subtilis</i> e teste de <i>Ames</i> com cepas TA98 e TA100 de <i>Salmonella typhimurium</i> , com e sem ativação do sistema metabólico exógeno S9. Aberrações cromossômicas em eritrócitos da medula óssea de camundongos. Alquilação do nucleófilo 4- (p- nitrobenzil) piridina (composto com características nucleofílicas semelhantes às bases de DNA).	Não estabelecido	Uso proibido do sorbato em produtos cárneos cozidos que levam nitrito. Limite máximo de 150 mg kg ⁻¹ de nitrito residual em produtos cárneos.	Namiki et al. (1980), Mukherjee et al. (1988), EFSA (2015a) e Brasil (2019). Perez-Prior et al. (2008), Perez-Prior et al. (2010) e EFSA (2015a).
Óxido de acetonitrila (ACNO) (7063-95-8)	Decomposição do ENA				
5-nitro-2,4- hexadienóico ácido metil ester (CAS não encontrado)	Reação entre nitrito e sorbato sob aquecimento	Genotoxicidade e mutagenicidade em <i>rec-assay</i> com <i>B. subtilis</i>			Osawa, Namiki (1982); EFSA (2015a)

Tabela 1 – Principais dados e evidências sobre os compostos tóxicos formados pela interação entre conservantes e processamento de carnes.

<i>Continua</i>					
Composto (Número do CAS)	Como é formado?	Existe evidência de toxicidade?	Está estabelecido um índice de ingestão diária?	Existem limites regulatórios em carnes? E para outros alimentos?	Referências
<i>Interações de conservantes e matriz cárnea</i>					
<i>N</i> -nitrosodimetilamina (NDMA) (62-75-9)		Genotoxicidade e mutagenicidade positivas no teste de <i>Ames</i> com cepas YG7108, TA98, TA100, TA1535 e TA1537 de <i>Salmonella typhimurium</i> ; mutação reversa em <i>Escherichia coli</i> WP2 uvrA; hepatócitos em camundongos (estudos <i>in vivo</i>).			CEPA (1999), IARC (2001) e USD (2018).
<i>N</i> -nitrosodibenzilamina (NDBzA) (5336-53-8)					
<i>N</i> -nitrosodimetilamina (NDMA) (62-75-9)	Reação entre aminas, amidas ou alquilurêias com o cátion nitrosônio (NO+).	Evidência de indução de tumores no fígado, esôfago, mucosa oral, rins, pâncreas, bexiga urinária, pulmão e tireoide de camundongos.	0.0004 – 0.016 µg kg ⁻¹ /dia	10 µg kg ⁻¹ em carnes curadas. Máximo de 4 µg kg ⁻¹ de NDMA e NDEA em carnes defumadas	CEPA (1999), IARC (2010a), Mestankova et al. (2014), Kobayashi (2018) e USDA (2018).
<i>N</i> -nitrosodietilamina (NDEA) (200-226-1)					
<i>N</i> -nitrosopiperidina (NPIP) (100-75-4)	Compostos podem estar contidos na fumaça (defumação)				
<i>N</i> -nitrosopirrolidina (NPYR) (930-55-2)					
<i>N</i> -nitrosodibutilamina (NDBA) (924-16-3)					
<i>N</i> -nitrosomorfolina (NMOR) (59-89-2)					
<i>N</i> -nitrosotiazolidina (NThZ) (73870-33-4)					
4-metilimidazol (4-MEI) (822-36-6)	Aquecimento de aldoses/cetoses com substâncias ácidas ou alcalinas na produção de corante sintético de caramelo.	Aumento das taxas de adenomas e carcinomas no pulmão de camundongos (estudos realizados com alimentação com ratos F344 e com camundongos B6C3F1).	300 mg kg ⁻¹ dos corantes E150c ^a e E150d ^b /dia	Concentração máxima de 200 mg kg ⁻¹ do 4-MEI em E150c e 250 mg kg ⁻¹ no E150d	NTP (2007), EFSA (2011), IARC (2011) e EU (2012).
2-metilimidazol (2-MEI) (616-47-7)					
2-acetil-4-tetra-hidroxi-butylimidazol (THI) (94944-70-4)					
Semicarbazida (SEM) (57-56-7)	Decomposição térmica da azodicarbonamida e/ou metabólicos de antibióticos nitrofuranos	Alterações na morfologia testicular, inibição da síntese e função do ácido gama-aminobutírico no peixe-zebra. Diminuição do peso corporal e degeneração da cartilagem articular de camundongos.	Em torno de 2 µg kg ⁻¹ /dia	Máximo de 45 mg kg ⁻¹ de azodicarbonamida em farinhas e uso banido de antibióticos nitrofuranos na produção animal.	EU (2004), Takahashi et al. (2014), EFSA (2015b), Bhagan et al. (2016) e Yu et al. (2017).

Tabela 1 – Principais dados e evidências sobre os compostos tóxicos formados pela interação entre conservantes e processamento de carnes.

					<i>Conclusão</i>
Composto (Número do CAS)	Como é formado?	Existe evidência de toxicidade?	Está estabelecido um índice de ingestão diária?	Existem limites regulatórios em carnes? E para outros alimentos?	Referências
<i>Interações dos componentes da matriz cárnea e processamento</i>					
Acrilamida (79-06-1)	Processament o térmico de biomoléculas (amido) e reação de Maillard.	Aumento dos riscos de câncer endométrio e de ovário, através de estudos com incubação gástrica, injeção intraperitoneal e aplicação dérmica em camundongos. Análise prospectiva conclusiva do consumo de acrilamida com risco aumentado de câncer de endométrio e ovário na pós- menopausa. O consumo de acrilamida foi relacionado a alergias na população dos EUA.	Faixa de 0.3 a 2.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ /dia.	--	Hogervorst et al. (2010) e EFSA (2015c).
Benzo [a] pireno (BaP) (50-32-8) Acenaftaleno (Acy) (208-96-8) Antaceno (Ant) (120-12-7) Benzo [a] antraceno (BaA) (6325-54-8) Acenafteno (Ace) (83-32-9) Benzo [b] fluoranteno (BbF) (205-99-2) Benzo [g, h, i] pireno (BgP) (191-24-2) Benzo [k] fluoranteno (BkF) (207-08-9) Fluoreno (Fln) (7782-41-4) Fluoranteno (Flt) (206-44-0) Indeno [1,2,3-cd] pireno (IcP) (193-39-5) Naftaleno (Naph) (91-20-3) Fenantreno (Phe) (85-01-8) Pireno (Pyr) (129-00-0)	Pirólise da matéria orgânica durante processos térmicos e combustão incompleta durante processos de defumação.	Genotoxicidade positiva com testes de aplicação dérmica, administração oral, intraperitoneal, intrapulmonar, intra- retal, intramamária e injeções intracolônicas dos compostos em ratos. Os efeitos como aumento da pressão arterial, distúrbios lipídicos e lipoprotéicos no sangue e resistência à insulina também foram revelados.	PAH8 29 ng kg^{-1} /dia	5 $\mu\text{g BaP kg}^{-1}$ e 30 $\mu\text{g PAH4 kg}^{-1}$ em carnes processadas (sem defumação) 2 $\mu\text{g BaP kg}^{-1}$ e 12 $\mu\text{g PAH 4 kg}^{-1}$ em produtos cárneos defumados.	EFSA (2008), IARC (2010b), EU (2011a), EU (2011b) e Zelinkova e Wenzl (2015).

PAH8: BaP, CHR, BaA, BbF, BkF, IcP, DhA e BgP; PAH4: BaP, CHR, BaA e BbF; E150c: corante de caramelo sintético (classe III, processo amônia); E150d: corante de caramelo sintético (classe IV, processo amônia sulfito).

A utilização do ácido sórbico e seus sais na conservação dos alimentos merece destaque. Características como maior solubilidade em relação a muitos conservantes, baixo efeito no sabor, baixo custo e liberação para adição nos mais diversos alimentos tornam esse composto muito utilizado pela indústria. Além disso, apresentam efeitos inibitórios sobre leveduras, fungos filamentosos e uma vasta gama de bactérias Gram positivas e Gram negativas (por exemplo, *Clostridium*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio*). (SOFOS, 1995; THOMAS; DELVES-BROUGHTON, 2014). Estudos sobre carcinogenicidade, teratogenicidade, mutagenicidade e demais investigações toxicológicas extensivas foram realizadas durante a aprovação do uso de ácido sórbico e seus sais em alimentos (FDA, 1975; MÜNZNER; GUIGAS; RENNER, 1990). Apesar do sorbato ser reconhecido como uma substância segura, casos de intolerância idiossincrática, urticárias e pseudo-alergias em pessoas sensibilizadas foram reportadas (HAAHTELA; HANNUKSELA, 1987; JUHLIN, 1981; WALKER, 1990). Relatos sobre danos ao DNA de células humanas também foram reportados. Embora o mecanismo exato não tenha sido reportado, a alquilação de bases do DNA foi postulada como responsável por danos a linfócitos durante experimentos *in vitro* (MAMUR et al., 2010). Atualmente, outros conservantes como nisina, natamicina, diacetato e propionato são permitidos para diversas categorias de produtos cárneos (BRASIL, 2019). No entanto, existem algumas restrições ao uso do sorbato dependendo da categoria do produto cárneo. O uso combinado do nitrito e sorbato em produtos cárneos submetidos a cozimento não é permitido na maioria dos países. No Brasil e nos Estados Unidos, a preocupação com o sorbato é bastante enfatizada, podendo somente ser utilizado na superfície de produtos cárneos secos, curados e fermentados, além do tratamento de tripas e envoltórios antes do cozimento (BRASIL, 2019; USA, 2012).

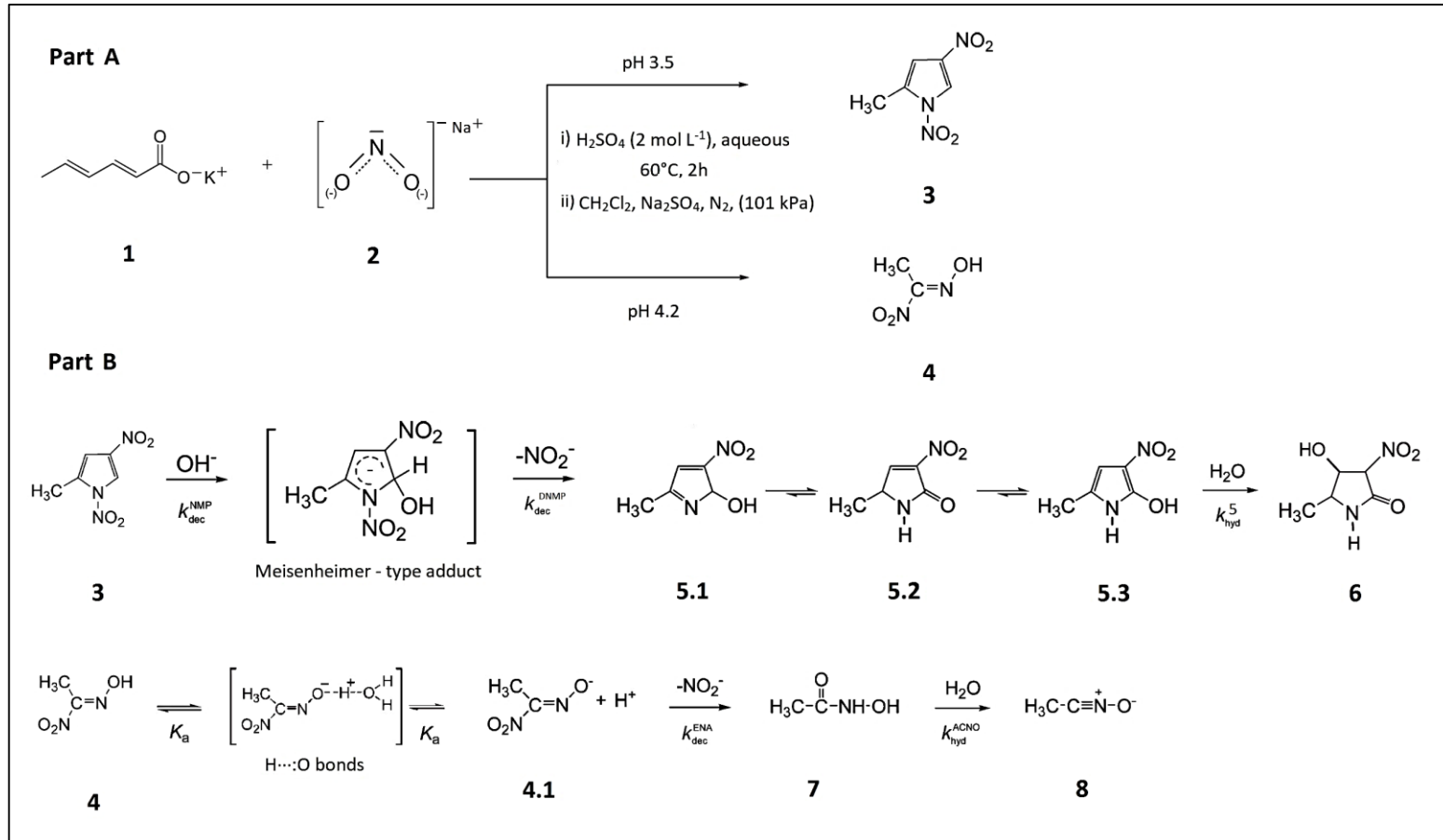
Por outro lado, os efeitos positivos do uso combinado do sorbato de potássio com nitrito de sódio em produtos cárneos foram relatados (ROBACH; STATELER, 1980; ROBACH; SOFOS 1982; ZAMORA; ZARITZKY, 1987). Quando combinado com ácido sórbico, o teor de nitrito em embutidos cárneos pode ser reduzido consideravelmente, diminuindo a formação de nitrosaminas e mantendo efetiva ação sobre *C. botulinum* (SOFOS, 1985). Entretanto, a reação entre os conservantes formaram o ácido etilnitrólico (ENA) e 1,4-dinitro 2-pirrol (DNMP), compostos com propriedades mutagênicas (Figura 2, parte A) (NAMIKI et al., 1980; NAMIKI et al., 1981). Esses compostos podem ser formados quando o nitrito está em proporção maiores que o sorbato

(aproximadamente 8:1, respectivamente) (KADA, 1974; NAMIKI; KADA, 1975; KITO; NAMIKI; TSUJI, 1978; NAMIKI et al., 1981). Entretanto, foi relatado que eles também podem ser formados em baixas proporções de nitrito e sorbato (até 2:1, respectivamente) (HARTMAN, 1983). De acordo com os métodos de síntese postulados desses compostos, a otimização da sua formação se dá na faixa de pH 3,5-4,2 e temperatura de $60 \pm 10^\circ\text{C}$, de acordo com a figura 1, parte A (NAMIKI et al., 1981).

Osawa e Namiki (1982) isolaram e identificaram os produtos formados pela reação entre NaNO_2 e compostos análogos ao ácido sórbico (grupo dienólico simples ligado a carbonila), uma vez que são semelhantes a outros aditivos alimentares empregados em alimentos. A formação do grupo C-nitro conjugado foi essencial para conferir mutagenicidade do composto formado. Segundo os principais resultados do estudo, ENA e DNMP foram os principais produtos mutagênicos formados na reação. Os últimos dados da literatura demonstram que o ENA possui uma reatividade de pelo menos 40 vezes superior ao ácido sórbico sozinho e 30 vezes em relação ao nitrito. Além disso, o DNMP e ENA demonstraram ação mutagênica no teste de *Ames* empregando cepas TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* e no teste *rec-assay* usando *Bacillus subtilis*, com e sem ativação metabólica de S9 (NAMIKI; KADA, 1975; HANSEN; TANNENBAUM; ARCHER, 1981) (Tabela 1).

Pérez-Prior et al. (2009a) conduziram um estudo para elucidar os mecanismos do DNMP como agente alquilante. Foi utilizado a 4-(p-nitrobenzil) piridina (NBP), uma armadilha para agentes alquilantes com características semelhantes às bases de DNA. Durante os estudos, foi revelado que a molécula de DNMP se decompõe em condições alcalinas, e que a reação de alquilação do NBP não ocorre de forma direta. Um produto intermediário da decomposição do DNMP proveniente de reações com íons hidróxido, denominado adulto tipo Meisenheimer sofre a perda de íons nitrito. As espécies formadas resultam em diferentes isômeros que permanecem sob equilíbrio (Figura 2, parte B). Segundo os pesquisadores, um desses isômeros pode ser o responsável por danos ao DNA (PÉREZ-PRIOR et al., 2009a). Já os mecanismos de alquilação do ENA, revelaram que o produto de decomposição óxido de acetonitrila (ACNO) é o principal agente mutagênico (Figura 2, parte B). Por outro lado, o DNMP apresentou um grau incomum de reatividade em relação a outros tipos de pirróles sem o grupo nitro no anel (PÉREZ-PRIOR et al., 2008; PÉREZ-PRIOR et al., 2009b; PÉREZ-PRIOR et al. 2010).

Figura 1– Parte A: Interação entre o sorbato de potássio (1) e o nitrito de sódio (2), sob condições experimentais específicas formando espécies químicas como o 2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP) (3) e o ácido etilnitrótico (ENA) (4). Parte B: decomposição do DNMP e ENA produzindo espécies químicas reativas com potencial mutagênico, como os isômeros estruturais (5.1, 5.2, 5.3), 5-metil-3-nitro-1H-pirrol-2 (5H) -ona (6), óxido de acetonitrila (8), entre outros intermediários (4.1 e 7).



Binstock et al. (1998) avaliaram as condições de pH, temperatura e a presença de outros reagentes na formação de ENA e DNMP. Esses experimentos foram realizados *in vitro*, num sistema modelo que se assemelhou a um produto cárneo. Apesar de ser difícil simular matrizes complexas como alimentos processados, os resultados revelaram a potencial formação dos compostos em condições semelhantes às reais. Apesar de estarem presentes no meio líquido, moléculas com propriedades quelantes e oxidantes, como por exemplo, aminoácidos e ascorbato, a formação dos compostos foi confirmada. Entretanto, os autores observaram que a formação do DNMP foi reduzida na presença do ácido ascórbico. Por outro lado, o ENA foi detectado em todos os sistemas testados com agentes inibidores.

Estudos posteriores realizados na área da Química Orgânica revelaram conhecimentos profundos sobre os aspectos físico-químicos do ENA e DNMP (PÉREZ-PRIOR et al., 2008; PÉREZ-PRIOR et al., 2009b; PÉREZ-PRIOR et al., 2009). No entanto, poucos estudos estão disponíveis atualmente na literatura sobre esses compostos nos alimentos. De acordo com o último boletim publicado pela EFSA sobre os aspectos atuais sobre o uso do sorbato em alimentos (“Painel de Aditivos Alimentares e Fontes de Nutrientes Adicionados aos Alimentos”), pesquisas futuras são recomendadas sobre a ocorrência de ENA e DNMP em condições reais de processamento (EFSA, 2015a). Apesar disso, estudos recentes evidenciaram que o uso irregular de ácido sórbico e nitrito de sódio em produtos cárneos ainda persiste nos dias atuais. Esses, e parecem ser rotineiramente utilizados em conjunto em determinadas localidades do mundo (ZHANG et al., 2018; MOLOGNONI et al. 2018a; MOLOGNONI et al., 2018b).

Diversas amostras de produtos cárneos foram analisadas quanto ao seu teor de ácido sórbico, nitrito, nitrato e DNMP (MOLOGNONI et al., 2018a). De modo surpreendente, o DNMP foi quantificado ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em todas as amostras. Mesmo sendo proibido o uso do sorbato em categorias de produtos cárneos cozidos adicionados de nitrito nas formulações, muitas amostras contendo os dois conservantes foram reveladas. Por outro lado, a Organização Mundial de Saúde (OMS) defendeu a reformulação mundial de alimentos processados e preparados para alcançar o menor teor de sódio possível, devido à associação do excesso de sódio com a hipertensão (WHO, 2006b). Entretanto, um impacto considerável e outras implicações na fabricação de produtos cárneos processados podem ter sido gerados, sob o ponto de vista da segurança alimentar (TAORMINA, 2010). Dessa forma, visando o equilíbrio entre a atividade de água *versus*

a proliferação de micro-organismos indesejáveis, isso pode ter aberto a possibilidade da adição de outros aditivos *GRAS* pelas indústrias, como o sorbato de potássio.

3 INTERAÇÕES ENTRE CONSERVANTES, MATRIZES CARNEAS E PROCESSAMENTO

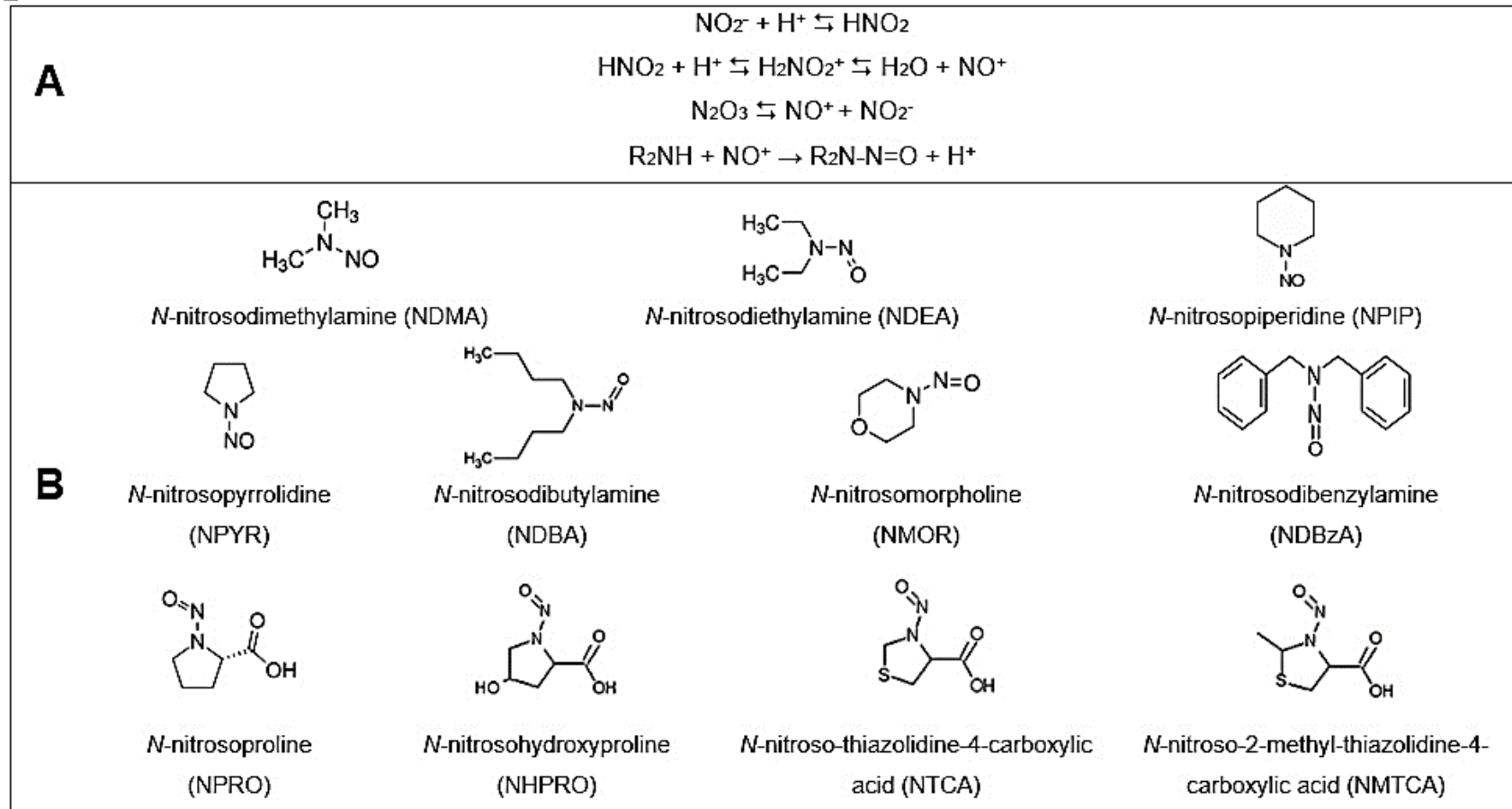
3.1 Nitrosaminas

As nitrosaminas voláteis (VNA) e não voláteis (NVNA) são espécies químicas caracterizadas pelo grupo *N*-nitroso. A maioria das nitrosaminas foi reconhecida como cancerígena para humanos (KOBAYASHI, 2018) (Tabela 1). Desde a década de 50, vários estudos sobre a formação e toxicidade desses compostos em alimentos têm sido reportados, uma vez que são reconhecidos como uma das principais formas de exposição humana a compostos cancerígenos (MAGEE; BARNES, 1956; LIJINSKY, 1999; BULUSHI et al., 2009; HERRMANN; GRANBY; DUEDAHL-OLESEN, 2015; KOBAYASHI, 2018). De fórmula molecular genérica $R_2N-N=O$ (Figura 3, parte A), as nitrosaminas podem ser formadas em altas temperaturas e/ou baixo pH (como no estômago), a partir de reações entre aminas, amidas ou alquiluréias com o cátion nitrosônio (NO^+). Esse último, um potente agente nitrosante produzido a partir da decomposição do nitrito residual (NO_2^-) utilizado em sais de cura ou de óxidos de nitrogênio formados durante o processamento térmico da carne (LIJINSKY, 1999; HONIKEL, 2008). A fumaça utilizada na defumação de carnes também pode conter nitrosaminas, favorecendo a contaminação desses alimentos quando sujeitos a essas formas de processamento (KOCAK et al., 2012). Contrariando a lógica entre muitos artigos de pesquisa, estudos recentes demonstram que em baixas temperaturas também podem favorecer reações de nitrosação de aminas biogênicas (BAs) (KITADA; SUDA; TAKENAKA, 2017).

As aminas biogênicas (BAs) são formadas principalmente por reações de descarboxilação de aminoácidos durante rotas metabólicas de bactérias em matrizes de origem animal. As BAs vêm desempenhando papel importante como marcador sanitário e qualidade de processamento, uma vez que a deterioração desses alimentos ocasionado por reações microbiológicas podem gerar grandes quantidades de cadaverina, putrescina, histamina, entre outras (PRESTER, 2016; CZAJKOWSKA-MYSŁEK; LESZCZYŃSKA, 2017). Dessa forma, a descarboxilação de aminoácidos constitui-se em

uma das principais fontes de amins biogênicas precursoras de nitrosaminas em produtos à base de carne. Pescados e produtos cárneos são meios reativos propícios à formação de nitrosaminas, devido à potencial fonte de amins alifáticas (HONIKEL, 2008). Embora sejam perigos químicos relacionados ao processamento industrial, as nitrosaminas podem também estar presentes em concentrações basais em matérias-primas de carne fresca (DE MEY et al., 2015). As principais nitrosaminas encontradas nos produtos cárneos são: *N*-nitrosodimetilamina (NDMA) *N*-nitrosodietilamina (NDEA), *N*-nitrosopiperidina (NPIP), *N*-nitroso-hidroxirolina (NHPRO), *N*-nitrosoprolina (NPRO), *N*-nitrosopirrolidina (NPYR), *N*-nitroso-2-metil-tiazolidina-4-ácido carboxílico (NMTCA), *N*-nitroso-tiazolidina-4-ácido carboxílico (NTCA), *N*-nitrosodibutilamina (NDBA), *N*-nitrosomorfolina (NMOR) e *N*-nitrosodibenzilamina (NDBzA) (Figura 3, parte B) (GLÓRIA, BARBOUR, SCANLAN, 1997; HERRMANN; DUEDAHL-OLESEN; GRANBY, 2015; DE MEY et al., 2015). Por outro lado, alcaloides, amins secundárias proveniente de condimentos e embalagens plásticas (contendo dibutil ou dietilditiocarbamato) podem sofrer nitrosação e formar nitrosaminas (NAKAMURA; KATOH; KAWABATA, 1981; FIDDLER et al., 2008; DOMAŃSKA; KOWALSKI, 2003).

Figura 2– Reações (parte A) e estruturas químicas (parte B) das principais nitrosaminas detectadas em produtos cárneos.



N-nitrosodimetilamina (NDMA) *N*-nitrosodietilamina (NDEA), *N*-nitrosopiperidina (NPIP), *N*-nitroso-hidroxiprolina (NHPRO), *N*-nitrosoproline (NPRO), *N*-nitrosopirrolidina (NPYR), *N*-nitroso-2-metil-tiazolidina-4-ácido carboxílico (NMTCA), *N*-nitroso-tiazolidina-4-ácido carboxílico (NTCA), *N*-nitrosodibutilamina (NDBA), *N*-nitrosomorfolina (NMOR) e *N*-nitrosodibenzilamina (NDBzA)

As concentrações de nitrosaminas dos grupos VNA e NVNA encontradas na literatura para produtos cárneos e pescados são muito variado, estando na ordem de μg de nitrosaminas por kg de produto. As concentrações das nitrosaminas estão relacionadas às diferentes espécies químicas (*N*-nitroso) e na qualidade da metrologia química aplicada, especialmente em relação aos limites analíticos e as incertezas dos resultados (CREWS, 2010; HERRMANN et al., 2015; HERRMANN; DUEDAHL-OLESEN; GRANBY, 2015). Existe uma correlação direta, mas não necessariamente linear, da concentração de algumas nitrosaminas com a quantidade de sais de cura adicionados como fonte de nitrito (HERRMANN; DUEDAHL-OLESEN; GRANBY, 2015). Assim, é necessário controlar o uso desses aditivos durante a formulação dos produtos cárneos, bem como as condições de frescor das matérias-primas cárneas e as condições de higiene no processamento (boas prática de fabricação).

A regulamentação para o uso de nitrito em produtos cárneos geralmente estabelece níveis máximos para a adição (exemplo, Europa), ou um limite máximo residual no produto final (exemplo, Brasil), que geralmente é cerca de 150 mg kg^{-1} (HERRMANN; DUEDAHL-OLESEN; GRANBY, 2014; BRASIL, 2019). No caso específico das nitrosaminas, países como Estados Unidos e Canadá determinam um limite regulatório de no máximo $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para VNA em embutidos cárneos curados (USA, 2012; CFIA, 2018). Países da Europa Oriental, como Rússia e Estônia, estabelecem limites mais rígidos, que variam de 2 a $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ em alimentos frescos e defumados, respectivamente (KOMAROVA; VELIKANOV, 2001; YURCHENKO; MÖLDER, 2006).

Os níveis máximos de exposição dos consumidores às nitrosaminas também são muito variáveis na literatura. Song, Wu e Guan (2015) utilizaram de metanálise para concluir que o consumo de altos níveis de nitrito e NDMA aumentam o risco de desenvolver alguns tipos específicos de carcinomas. No entanto, considerando as limitações do estudo, dados adicionais são necessários para entender o papel das nitrosaminas na etiologia da neoplasia gástrica maligna. As estimativas do consumo diário de NDMA conforme relatado na tabela 1, podem não representar adequadamente o cenário atual, principalmente em relação às quantidades de outras nitrosaminas consumidas diariamente. Além disso, vários estudos relataram concentrações de nitrosaminas em amostras ambientais (devido a ações antropogênicas) e em outros tipos de alimentos (CEPA, 2001).

A carcinogenicidade do NDMA foi atribuída à geração de um metabólito ativo (o íon metildiazônio). A ingestão parece ser a principal via de exposição humana ao NDMA, porque os estudos em animais sobre inalação e carcinogenicidade cutânea ainda são limitados. Por outro lado, muitos dos dados sobre nitrosaminas em produtos cárneos foram obtidos entre os anos 1970 e 1990, quando o acesso à instrumentação analítica sensível era limitado. Além disso, as consequentes mudanças no processamento de alimentos e no controle de qualidade ainda não estavam em vigor. Ainda há muito a ser pesquisado sobre condições favoráveis e desfavoráveis para a formação de nitrosaminas em alimentos, embora já exista um consenso sobre a contribuição das nitrosaminas para dietas não saudáveis. Nesse cenário, deve-se ter em mente que outros ingredientes alimentares, além de sais de cura, bem como outros conservantes e processos industriais, podem contribuir para a formação de nitrosaminas. Além disso, a estratégia de diminuir a concentração de sais de cura na formulação de produtos cárneos como medida preventiva para a formação de nitrosaminas pode produzir bons resultados, desde que outros aspectos sanitários não sejam comprometidos. Portanto, essas ações devem continuar sendo incentivadas e regulamentadas.

3.2 Compostos induzidos pelo processamento e degradação de aditivos

3.2.1 *N*-alquil-imidazol

Corantes caramelo são utilizados em vários alimentos, incluindo carnes processadas. Eles consistem em misturas complexas feitas a partir do aquecimento de aldoses com ácidos, álcalis e sais (CHAPPEL; HOWELL, 1992; GOLON; KUHNERT, 2012). No processamento dos corantes de caramelo sintéticos classe III (E150c, processo de amônia) e IV (E150d, processo de amônia-sulfito), compostos de baixa massa molecular com propriedades carcinogênicas, como o 4-metilimidazol (4-MEI), seu isômero estrutural 2-metilimidazol (2-MEI) e o 2-acetil-4-tetra-hidroxi-butilimidazol (THI) podem ser formados (NTP, 2007; JECFA, 2011; VOLLMUTH, 2018) (Tabela 1). O composto 4-MEI ganhou destaque na opinião pública devido às grandes fábricas de refrigerantes que empregam o corante caramelo classe IV em seus produtos consumidos em todo o mundo (VOLLMUTH, 2018). Estudos revelaram evidências claras de

atividade carcinogênica em camundongos, com base no aumento da incidência de neoplasias pulmonares após exposição contínua ao 4-MEI (NTP, 2007) (Tabela 1). Embora os resultados tenham sido questionados, esse estudo contribuiu para a inclusão do 4-MEI na lista de substâncias cancerígenas para humanos em alguns países (OEHHA, 2012; VOLLMUTH, 2018). Já a IARC incluiu o composto 4-MEI no grupo 2B “possivelmente carcinogênico para humanos” (IARC, 2011).

Após anos de estudos e dados toxicológicos, a EFSA definiu um índice de ingestão diário máximo de 100 mg de corante de caramelo sintético por kg de peso corpóreo. Em relação ao 4-MEI, foi considerado seguro em níveis máximos de 200 mg kg⁻¹ no corante de caramelo classe III e 250 mg kg⁻¹ para o de classe IV. No entanto, as agências reguladoras concluíram que não havia razão para acreditar em qualquer risco imediato apresentado pela exposição ao 4-MEI pela dieta. As concentrações de 4-MEI e THI em bebidas, produtos cárneos e outros alimentos adicionado de corantes sintéticos de caramelo foram relatadas em ordem de µg kg⁻¹ (KARIM; SMITH, 2015; CHEN et al., 2018; FIERENS et al., 2018; JACOBS et al., 2018). Embora os estudos demonstrem que esses compostos geralmente não são quantificados em carnes processadas, uma preocupação quanto ao baixo número de pesquisas sobre a ocorrência de alquilimidazóis em alimentos foi manifestado (MOTTIER et al., 2017).

Os alquilimidazóis também são subprodutos formados a partir de constituintes naturais dos alimentos durante o processamento térmico. Dessa forma, alguns pesquisadores os consideram como marcadores inadequados para o controle de contaminantes imidazóis provenientes da adição de corantes de caramelo sintético (MOTTIER et al., 2017).

Contudo, os corantes de caramelo são importantes ingredientes no processamento de carnes, alguns deles sendo permitidos em *quantum satis*. A exposição humana e o risco toxicológico pelo consumo do 4-MEI, 2-MEI e THI em produtos cárneos ainda precisam ser avaliados e esclarecidos, a fim de determinar a importância de seu monitoramento nos programas de saúde pública.

3.2.2 Azodicarbonamida

A azodicarbonamida é um conservante autorizado no beneficiamento da farinha de trigo destinada à panificação em alguns países (CHEN et al., 2015). Durante o

processamento térmico e desempenhando suas características expansivas, ela pode ser decomposta em biureia, urazol e semicarbazida. A semicarbazida foi classificada pela IARC no grupo 3, "não classificável quanto à sua carcinogenicidade para seres humanos", uma vez que não havia estudos suficientes sobre sua toxicidade para humanos, e as evidências limitadas sobre a sua carcinogenicidade em animais (IARC, 1987).

A carcinogenicidade e toxicidade crônica da semicarbazida foi avaliada em camundongos submetidos a dietas com até 250 mg dia por um período de 52 semanas. Foram relatados uma diminuição no peso corporal e degeneração da cartilagem articular dos animais. Entretanto, a formação de carcinomas não foi evidenciado (TAKAHASHI et al., 2014). Yu et al. (2017) constataram alterações na morfologia testicular do peixe-zebra quando exposto à semicarbazida. A inibição da síntese e função do ácido gama-aminobutírico, bem como a diminuição da expressão dos reguladores reprodutivos foram postulados durante o estudo (Tabela 1).

A semicarbazida pode estar presente em baixas concentrações em algas, camarões e ovos, sendo formada a partir de substâncias naturalmente presentes nesses alimentos, como arginina e creatina. Também foi revelada a formação de semicarbazida em amostras de alimentos tratadas com hipoclorito durante a desinfecção ou branqueamento (HOENICKE et al., 2004). No entanto, a maioria dos estudos disponíveis relata a contaminação de carnes com semicarbazina através da biotransformação metabólica de antibióticos nitrofuranos (MULDER; BEUMER; VAN RHIJN, 2007). Após a administração da nitrofurazona em animais de produção, ela é rapidamente metabolizada e convertida em semicarbazida através do metabolismo animal (KWON, 2017).

Por outro lado, a contaminação de alimentos com semicarbazida também é proveniente da decomposição térmica da azodicarbonamida, fato que resultou na sua proibição na União Europeia (UE, 2004). A semicarbazida pode ser quantificada em produtos cárneos à milanesa, feitos com farinha tratada com azodicarbonamida. Além disso, resultados falso-positivos para nitrofurazona podem ser obtidos ao utilizar o marcador semicarbazina (MULDER; BEUMER; VAN RHIJN, 2007; KWON, 2017). Por outro lado, a biureia foi considerada um bom marcador de contaminação, pois é exclusiva da decomposição térmica da azodicarbonamida (MULDER; BEUMER; VAN RHIJN, 2007). A *Food and Drug Administration* (FDA) conduziu uma avaliação abrangente sobre o uso seguro da azodicarbonamida através da exposição estimada de semicarbazida

na população dos EUA (BHAGAN et al., 2016). A azodicarbonamida foi considerada segura quando utilizada nos níveis máximos de 45 mg kg⁻¹ na farinha de panificação. Não foram recomendadas alterações nas dietas dos consumidores.

A azodicarbonamida não é um aditivo permitido para uso direto em produtos cárneos, pois não possui finalidade tecnológica nesses alimentos. No entanto, pode ser um motivo de preocupação em produtos cárneos preparados à milanesa (empanados), porque diferentes tipos de farinhas podem ser utilizadas no reaproveitamento de indústrias da panificação. Assim, pesquisas futuras sobre os riscos da ingestão de azodicarbonamida pelos consumidores de produtos cárneos à milanesa são de interesse especial.

4 PRODUTOS DA INTERAÇÃO ENTRE TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO E MATRIZ CÁRNEA

Esta seção discute os caminhos de formação de espécies carcinogênicas e mutagênicas que não estão diretamente relacionadas aos aditivos regulamentados. A contaminação dos alimentos pode provir de diferentes etapas do processamento, como ambiente, transporte de matérias-primas, limpeza e esterilização de equipamentos, embalagens, entre outras formas. No entanto, as reações entre os constituintes dos alimentos com o processamento térmico estão entre as fontes formadoras de compostos tóxicos nos alimentos processados.

4.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os alimentos podem ser contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em diferentes maneiras, através do ambiente (solo, água e ar) acumulando-se a superfície de vegetais, frutas, sementes, grãos e peixes, em processos térmicos industriais (secagem e defumação) e técnicas culinárias (assar, grelhar e fritar) (BANSAL; KIM, 2015; NERÍN; AZNAR; CARRIZO, 2016; MOGOL; GÖKMEN, 2016). Os HPAs podem ser formados em altas temperaturas ao grelhar ou defumar carnes (LEE et al., 2016; MALARUT; VANGNAI, 2018). A pirólise de matérias orgânicas como as proteínas, gorduras e carboidratos acima de 200°C, contato direto da gordura com a fonte

de calor e através da combustão incompleta do carvão em contato direto com os alimentos constituem de diferentes fontes geradoras desses compostos. Os fragmentos de moléculas e radicais livres gerados durante esses processos se combinam para formar compostos aromáticos polinucleares estáveis (pirossíntese), movendo-se para os compartimentos hidrofóbicos da cadeia alimentar, e por fim retidos em alimentos ricos em gorduras (VIEGAS et al., 2014; BANSAL; KIM, 2015; FASANO et al., 2016; LEDESMA; RENDUELES; DÍAZ, 2016). Durante as reações que produzem HPAs, hidrogênio e carbono combinam-se em um composto cíclico com ligações simples e duplas alternadas, com dois ou mais anéis aromáticos condensados que conferem altos potenciais carcinogênicos e mutagênicos (AL-RASHDAN et al., 2010; BERTINETTI et al., 2018). (Tabela 1). Os HPAs com mais de quatro anéis aromáticos apresentam maior estabilidade, tornando-se com maior potencial de toxicidade. Esses compostos podem ser encontrados em alimentos de diversas classes (OLATUNJI et al., 2014).

Além dos alimentos, essas substâncias são consideradas contaminantes do meio ambiente. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) selecionou 16 HPAs como poluentes prioritários (USEPA, 2010): naftaleno (Naph); acenaftaleno (Acy); acenafteno (Ace); flúor (Fln); fenantreno (Phe); antraceno (formiga); fluoranteno (Flt); pireno (pir); benzo [a] antraceno (BaA); criseno (CHR); benzo [b] fluoranteno (BbF); benzo [k] fluoranteno (BkF); benzo [a] pireno (BaP); indeno [1,2,3-cd] pireno (IcP); dibenzo [a, h] antraceno (DhA); benzo [g, h, i] perileno (BgP).

O BaP tem sido considerado o principal marcador para a ocorrência de HPAs em alimentos, mesmo considerando que a quantificação de um único HPA não é considerado um bom indicador de contaminação (EFSA, 2008; FASANO et al., 2016). Assim, a soma de quatro HPAs, denominados “PAH4” (BaP, CHR, BaA e BbF) e a soma de oito HPAs, denominados “PAH8” (PAH4 + BkF, IcP, DhA e BgP) foram proposto para controlar esses compostos. Por outro lado, as propriedades cancerígenas de cada composto foram levadas em consideração durante a classificação dos HPAs. O BaP foi classificado no grupo 1 e os outros três HPAs relacionados ao PAH4 foram classificados no grupo 2B. Os compostos PAH8, como BkF e IcP, foram classificados no grupo 2B; O DhA foi classificado no grupo 2A. O BgP não foi classificado em nenhum grupo (IARC, 2010b). Devido aos diferentes níveis estipulados para BaP e PAH4, foram estabelecidos limites de acordo com a categoria de alimentos. Em produtos cárneos tratados termicamente, por

exemplo, a soma do PAH4 não deve exceder 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (UE, 2011b; BANSAL; KIM, 2015).

As exposições contínuas aos HPAs através do ambiente e da alimentação implicam em um potencial genotóxico e carcinogênico para seres humanos (Tabela 1). As mutações na replicação do DNA causadas pela ativação metabólica de HPAs em células de mamíferos por epóxidos de dióis, demonstram ser o processo inicial no desenvolvimento do cânceres. Também foram relatados efeitos não genotóxicos dos HPAs, como aumento da pressão arterial, níveis sanguíneos de lipídios/lipoproteínas e resistência à insulina (HU et al., 2015).

Vários estudos foram realizados para avaliar quais gêneros alimentícios são os principais contribuintes para a exposição humana aos HPAs. As principais categorias de alimentos incluem cereais e os alimentos de origem animal (peixe, crustáceos e produtos cárneos) submetidos a processamento industrial. A ingestão média para BaP foi estabelecida em 235 ng dia^{-1} e para PAH8 de 1729 ng dia^{-1} nos países europeus (EFSA, 2008).

4.2 Aminas heterocíclicas aromáticas

As aminas heterocíclicas aromáticas (HAA) são reconhecidos compostos de propriedades carcinogênicas formados durante o processamento térmicos dos alimentos. São geradas durante a pirólise de aminoácidos ou através da reação entre a creatina, assim como durante reações de Maillard. Dessa forma, o aumento da temperatura do processamento pode proporcionar um aumento na formação desses compostos em matrizes cárneas. Condições específicas do cozimento, pH, adição de açúcares e geração de radicais livres por oxidação lipídica podem inibir ou favorecer a formação de HAA em produtos cárneos (BUŁA et al., 2019).

As principais HAA consideradas prováveis agentes cancerígenos para humanos e que podem estar presentes em nos produtos cárneos são: 2-amino-3,8-dimetilimidazo [4,5-f] quinoxalina (MeIQx), 2-amino-3,4-dimetilimidazo [4,5-f] quinolina (MeIQ), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina (PhIP), 2-amino-3-metilimidazo [4,5-f] quinolina (IQ), 2-Amino-3-metilimidazo [4,5-f] quinoxalina (IQx), 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo [4,5-f] quinoxalina (4,8-DiMeIQx) e 2-amino-3,7,8-trimetilimidazo [4,5-

f] quinoxalina (7,8-DiMeIQx) (BARZEGAR; KAMANKESH; MOHAMMADI, 2019), entre outras.

Como a ocorrência de HAA é generalizada nos alimentos processados termicamente, a avaliação contínua de tais compostos tóxicos é de grande interesse em relação à segurança alimentar. Consumidores frequentes de carnes processadas têm maior risco de serem expostos aos HAA, podendo ser detectadas em fluidos biológicos durante estudos epidemiológicos (GALLAHER; TRUDO, 2017).

4.3 Acrilamida

A acrilamida e seus precursores são contaminantes em alimentos provenientes do processamento térmico. A acrilamida consiste de uma substância bastante reativa, com propriedades genotóxicas e carcinogênicas para mamíferos (HAMZALIOĞLU; MOGOL; GÖKMEN, 2019; JIANG et al., 2007; EL-ZAKHEM NAOUS et al., 2018; IARC, 1994). Essa substância é predominantemente formada em alimentos ricos em componentes amiláceos, submetidos a altas temperaturas ($> 120^{\circ}\text{C}$). A formação da acrilamida depende de muitas condições, como fenômenos de transferência de calor, meio (ar, gordura e água), tempo, atividade de água do alimento, pH e concentrações de grupos amino e carbonila. Também pode ser formada durante a reação de Maillard, especificamente entre a asparagina e um açúcar redutor (MICHALAK et al., 2017; HAMZALIOĞLU; MOGOL; GÖKMEN, 2019). Dessa forma, a substituição da farinha de trigo por outras provenientes de arroz, milho ou grão-de-bico, com diferentes conteúdos de asparagina livre pode afetar os níveis de acrilamida produzidos durante a fritura (PLATA-GUERRERO; GUERRA-HERNÁNDEZ; GARCÍA-VILLANOVA, 2009).

As concentrações de acrilamida em carnes grelhadas, fritas ou assadas demonstraram ser muito baixas (TREVISAN et al., 2016). Por outro lado, os produtos cárneos empanados e submetidos à fritura demonstraram ser potenciais fontes de formação de acrilamida (DEMIROK; KOLSARICI, 2014). Diferentes formas culinárias de aquecimento foram avaliadas na formação de acrilamida em croquetes de carnes (MICHALAK et al., 2017). A maior concentração de acrilamida ($420 \pm 29 \mu\text{g kg}^{-1}$) foi obtida por micro-ondas, seguida de assada ($360 \pm 27 \mu\text{g kg}^{-1}$), fritura ($298 \pm 31 \mu\text{g kg}^{-1}$)

e grelhada em frigideira ($285 \pm 34 \mu\text{g kg}^{-1}$). A fonte geradora de calor demonstrou um impacto significativo na formação de acrilamida. O aquecimento por forno de micro-ondas demonstrou a maior formação de acrilamida durante o estudo no produto cárneo empanado.

A formação potencial de acrilamida nos alimentos de consumo diário é uma grande preocupação (SARAJI; JAVADIAN, 2019). Depois de entrar na corrente sanguínea, a acrilamida é distribuída em todo o corpo humano podendo gerar danos à saúde dos consumidores (GUO et al., 2017). O alto consumo de acrilamida pode danificar o sistema neural (COSTA, 1996) e gerar infertilidade (CHAPIN, 1995). O consumo de acrilamida e alergias também foram associados, o que torna-se um enorme problema de saúde pública, manifestado por distúrbios clínicos como a asma. Fatores como dieta, idade, sexo e tabagismo são variáveis relevantes (GUO et al., 2017). De acordo com dados experimentais realizados em animais de laboratório, JECFA estabeleceu níveis máximos de consumo de acrilamida por dia entre 0,3 e 2 μg de acrilamida por kg de peso corpóreo, reduzindo os riscos as alterações neurológicas, reprodutivas, entre outras, em humanos (WHO 2002; WHO, 2005).

5 MÉTODOS ANALÍTICOS ATUAIS DE CONTROLE

Alguns desafios analíticos podem surgir durante análises químicas de matrizes complexas como carnes processadas. O processamento de carnes geralmente produz grandes lotes, o que requer programas de amostragem baseados em estatística para alcançar resultados representativos (LINS; CONCEIÇÃO; MAURICIO, 2012). Além disso, são alimentos provenientes de misturas complexas que requerem alta sensibilidade e especificidade das técnicas analíticas, exigindo modelos de calibração adequados na produção de resultados confiáveis. A validação analítica, internacionalmente reconhecida e rastreável, é requerida após o desenvolvimento de novas ferramentas analíticas destinadas à análise de produtos cárneos (ABBAS et al., 2018). Dessa forma, a evolução dos métodos analíticos deve acompanhar o grau de sofisticação das adulterações ou dos reais riscos à saúde dos consumidores.

Uma ampla gama de instrumentação analítica tem sido empregada no monitoramento de conservantes e contaminantes em carnes processadas. Técnicas de

microanálise, por exemplo, a eletroforese da zona capilar (CZE) e cromatografia eletrocínica micelar (MEKC), têm sido usadas para analisar sais de cura (nitrito e nitrato) e ácidos orgânicos, respectivamente (DELLA BETTA et al., 2016; DING et al., 2015). Outras técnicas analíticas menos difundidas, como espectroscopia quantitativa de ressonância magnética nuclear de prótons ($^1\text{H-NMR}$) (OHTSUKI et al., 2012a; OHTSUKI et al., 2012b), espectroscopia de infravermelho (YANG et al., 2017; CHEN et al., 2017) e biossensores (NEDELJKO; TUREL; LOBNIK, 2017) também se mostram alternativas viáveis para monitorar o conteúdo de conservantes e contaminantes em produtos cárneos. Por outro lado, a cromatografia em camada delgada (TLC) e a cromatografia líquida de alta eficiência constituem-se de técnicas analíticas consagradas há anos. Dessa forma, são geralmente as primeiras abordagens analíticas utilizadas no controle de compostos orgânicos em alimentos. Muitos desses métodos não atendem mais às atuais expectativas e tendências do controle rigoroso dos alimentos. Entretanto, muitos ainda servem como base para o desenvolvimento de novas abordagens mais seletivas, sensíveis e reveladoras.

Kito, Namiki, Tsuji (1978) utilizaram TLC para caracterizar os mutagênicos ENA e DNMP em reações de síntese, durante um estudo pioneiro. Passados alguns anos, o grupo de pesquisa aperfeiçoou a seletividade da detecção, ao utilizar HPLC-UV com absorção molecular a 254 nm (Namiki et al. 1981). Na atualidade, sabe-se que se trata de um método com baixa seletividade para analisar esses compostos em matrizes complexas como as carnes processadas. Recentemente, foi desenvolvida uma ferramenta analítica capaz de analisar concentração em μg de DNMP em diferentes tipos de produtos de carnes utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) (MOLOGNONI et al., 2018a). Já a análise qualitativa do ENA em meio líquido foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) (BINSTOK et al., 1998).

Métodos analíticos rápidos, reproduzíveis e que forneçam um grande conteúdo de informações em curto tempo, geralmente denominados de "determinação simultânea", "detecção de múltiplas classes", "multi-resíduos", "multiuso" são escassos. Com exceção dos multi-resíduos de medicamentos veterinários e pesticidas, de fato, não se pode encontrar com facilidade na literatura métodos capazes de analisar simultaneamente diferentes compostos tóxicos provenientes do uso de aditivos e processamento de carnes.

A espectrometria de massas consiste em uma técnica sensível e versátil que fornece novas respostas para a resolução de velhos problemas (YOSHIMURA et al., 2016; LI et al., 2016). Acoplada a técnicas de separação, como a cromatografia líquida ou gasosa, permite o desenvolvimento de métodos com caráter de múltiplo propósito. Isso facilita o apoio laboratorial, uma vez que encurta o tempo de análise, reduz custo com a substituição de diversos métodos e proporciona uma vasta gama de informações de dados exploratórios (Tabela 2). Geralmente, é aplicada a mais de um composto/matriz com características físico-químicas distintas, mas que fazem parte do mesmo problema e risco associado ao consumidor.

Independentemente da técnica analítica empregada, a confiabilidade dos resultados deve ser avaliados por meio de procedimentos de validação (ISO, 2017). Na maioria das vezes, quando o método é submetido à rotina analítica ele se torna mais preciso à medida que o número de medidas (graus de liberdade) aumenta. Esse processo diminui gradualmente as incertezas experimentais obtidas durante a validação (MOLOGNONI et al., 2019). No entanto, uma medida sem sua abrangência declarada dificulta a correta interpretação dos resultados, que apoiará tomadas de decisões importantes. Consequências impactantes, como o recall de produtos, destruição de grandes lotes, aplicação de multas, processos administrativos e judiciais e danos para a saúde humana são alguns dos exemplos (Molognoni et al. 2017). Além disso, sanções e barreiras ao comércio internacional de alimentos podem ser fundamentadas, entre outras decisões políticas, na metrologia química ineficiente de países produtores. Nesse sentido, a capacidade analítica vai além das instrumentações modernas, já que a correta interpretação dos dados analíticos constitui-se de uma tarefa crucial (BACILA et al. 2017).

Apesar do conceito de incerteza de medição ser proveniente da metrologia dimensional, e há pouco tempo ser introduzida ao âmbito da Química Analítica, poucos métodos disponíveis na literatura trazem uma abrangência com alta probabilidade de acerto dos seus resultados. Dessa forma, a média como o valor mais provável do mensurando (analito) e o desvio padrão (com probabilidade de 68%) como a melhor estimativa de sua incerteza, ainda parece ser a abordagem mais utilizada pelos Químicos Analíticos (Tabela 2).

6 INIBIÇÃO DE COMPOSTOS CARCINOGENÉTICOS EM ALIMENTOS

A ativação metabólica de NOCs pode levar à formação de intermediários reativos contendo oxigênio e nitrogênio que ao reagir com biomoléculas conferem propriedades tóxicas, genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (MASUDA et al., 2000). A formação de NOCs tem atraído constante atenção por causa de seu potencial risco à saúde dos consumidores (MANDAL et al., 2018). Por outro lado, os componentes alimentares e algumas formas específicas de processamento podem modular compostos mutagênicos formados em alimentos e/ou sistemas vivos, sendo eficazes para inibir e desestabilizá-los (MANDAL et al., 2018).

O uso de ascorbato tem sido a abordagem mais comum para controlar a formação de NOCs em produtos cárneos. O uso da substância é permitido pelas maioria das agências reguladoras em *quantum satis* para formulações de produtos cárneos (JECFA, 1995). Os efeitos antioxidantes do ascorbato em diferentes formas (ascorbato, ácido ascórbico e ácido eritórbico) na inibição de VNA e NVNA foram investigados. O ácido eritórbico foi eficaz contra NHPRO, NPRO e NPIP. Segundo Herrmann, Granby e Duedahl-Olesen (2015), o palmitato de ascorbil apresentou menor efeito inibitório em relação ao ácido eritórbico. Por outro lado, uma mistura das duas formas não favoreceu a ação inibitória contra os compostos. O uso do ferro livre inibiu a formação de NTCA e NMTCA (HERRMANN; DUEDAHL-OLESEN; GRANBY, 2015).

Também foi avaliada a ação de sucos vegetais, cisteína, diferentes valores de pH e temperaturas na inibição de ENA e DNMP (OSAWA et al., 1986; PÉREZ-PRIOR et al., 2009b). A perda da mutagenicidade do DNMP, causada pela ação do ácido ascórbico foi atribuída à redução do grupo conjugado C-nitro em amino, para formar a estrutura 1-nitro 2-metil 4-amino pirrol (NMAP), gerando resultados negativos de mutagenicidade quando submetido a testes bacterianos (NAMIKI et al., 1980). O principal componente desmutagênico proveniente de sucos vegetais (abóbora e couve), foi o ácido ascórbico (OSAWA et al., 1986). Já o mecanismo de inativação por adição de cisteína envolveu o ataque direto à parte heterocíclica do DNMP, seguido da eliminação do grupo C-nitro, o que também favoreceu a perda da ação mutagênica. O tratamento com cisteína também produziu outros metabólitos além do NMAP. Entretanto, não foram elucidados na pesquisa (NAMIKI et al., 1980). A razão molar de DNMP e ENA em relação ao ácido

ascórbico ou cisteína demonstrou ser um fator importante. A eliminação das propriedades tóxicas do DNMP foi relatada quando um havia um excesso de mais de oito vezes de ácido ascórbico ou cisteína em relação ao utilizado ou na concentração basal dos compostos. No entanto, esse ambiente é muito diferente das reais condições encontradas em produtos cárneos submetidos a reais condições de processamento. Durante o estudo, a concentração de ENA não foi afetada pela adição de ácido ascórbico. Já com a adição de cisteína, uma diminuição em 75% da concentração de ENA foi revelada, em condição experimental em 16:1 (m/m) de cisteína e ENA, respectivamente (OSAWA et al., 1986; BINSTOK et al., 1998).

Namiki et al. (1981) testaram *in vitro* a estabilidade das soluções de DNMP e ENA quando presentes diferentes reagentes químicos, valores de pH e temperaturas, buscando simular condições encontradas durante o processamento de carnes. Ambos os compostos eram instáveis a temperaturas superiores a 100 °C e pH superior a 6,0. Em pH 6,0, o DNMP se decompôs com maior taxa em pH 9,47, através do ataque nucleofílico do OH- ao carbono eletrofilico da molécula. A presença do grupo nitro no anel pirrol reduziu a densidade eletrônica favorecendo o ataque nucleofílico (KITO; NAMIKI; TSUJI, 1978; PÉREZ-PRIOR et al., 2008). À medida que o pH aumentava, a estabilidade do ENA diminuía com a dissociação da molécula. A maior taxa de decomposição ocorreu em pH 9,52, quando a perda de NO₂⁻ propiciou rearranjo moleculares e formação do ACNO (Figura 2, parte B) (PÉREZ-PRIOR et al., 2008).

Os NOCs também podem ser metabolizados e degradados por micro-organismos, os quais utilizam como fonte de nitrogênio e carbono. A degradação de NOCs através de reações enzimáticas via nitroredutases envolvem vias metabólicas complexas que ainda não foram totalmente elucidadas. Essa área tem sido muito estudada, devido à sua ampla aplicação em ciências médicas e ambientais como remediação de poluentes (DE OLIVEIRA; BONATTO; HENRIQUES, 2010; SERRANO-GONZÁLEZ et al., 2018). No entanto, em Ciência dos Alimentos o uso de nitrorredutases ainda é pouco explorado.

Metodologias inovadoras também foram propostas para inibir a formação de HPAs, HAA e acrilamida, entre outros contaminantes provenientes ao processamento de alimentos. Foram estudados os efeitos do antioxidante terc-butil-hidroquinona (TBHQ) na redução de HPAs em frituras. Quando adicionado ao óleo de amendoim destinado à fritura, o TBHQ diminuiu as concentrações de PAHs em até 70%. Apesar dos resultados

surpreendentes, são necessários mais estudos para desvendar os mecanismos (ZHAO et al., 2017). Bactérias endofíticas (*Sphingobium* sp. RS1, *Sphingobium* sp. RS2, *Mycobacterium* sp. Pyr9, *Mycobacterium* sp. Phe15, *Mycobacterium* sp. 033, *Massilia* sp. Pn2, *Paenibacillus* sp. Phe3 e *Pseudomonas* sp. Ph6) estão sendo usadas para biodegradar HPA em vegetais (Wang et al., 2017). Bactérias ácido láctico (LAB) diminuíram o teor de HPAs em linguiças defumadas. As cepas de *Lactobacillus sakei* KTU05-6, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7 e *Pediococcus pentosaceus* KTU05-9, aplicadas antes e depois a defumação diminuíram significativamente a formação de BaP e CHR nos produtos (BARTKIENE et al., 2017). Entretanto, o mecanismo de ação atribuído na diminuição dos HPAs após a inoculação de LAB ainda não foi totalmente elucidado. A biodisponibilidade e os efeitos interativos entre os micro-organismos e os HPAs devem ser claramente conhecidos, pois são peças fundamentais para entender a inibição ou redução de contaminantes de alimentos como os HPAs (ABOU-ARAB et al., 2015).

As técnicas para a inibição de HAA e NOCs em produtos cárneos parecem ser as mais estudadas atualmente (LU; KUHNLE; CHENG, 2018; GIBIS; WEISS, 2017; TENGILIMOGLU-METIN; KIZIL, 2017; LORENZO; MUNEKATA; DOMÍNGUEZ, 2017; BARTKIENE et al., 2017; HERRMANN; DUEDAHL-OLESEN; GRANBY, 2015). A combinação de processos industriais podem tornar o ambiente químico desfavorável à formação de nitrosaminas, minimizando os riscos para os consumidores (DE MEY et al., 2014). Entre as principais abordagens, destaca-se o uso de temperos específicos, fibras naturais, LAB e extratos vegetais. A formação de 2-amino-3-metilimidazo [4,5-f] quinolina durante a fritura de carne de porco foi significativamente reduzida em 0,5% ao utilizar extratos de plantas de *Sonchus olearleu*, devido ao potencial antioxidante conferido pelo elevado conteúdo fenólico (TENG et al., 2019).

Outras medidas preventivas, como o uso de outros antioxidantes (vitaminas C e E) e a irradiação de alimentos, podem diminuir a formação de nitrosaminas (AHN et al., 2002; POURAZRANG; MOAZZAMI; BAZZAZ, 2002; HERRMANN; DUEDAHL-OLESEN; GRANBY, 2015). Apesar de seus mecanismos ainda não totalmente divulgados, a redução dos compostos através de propriedades antioxidantes dos aditivos (VITAGLIONE; FOGLIANO, 2004), conversão em enzimas específicas produzidas por células animais e vegetais (FUCHS et al., 2008), adsorção aos componentes da parede

celular dos micro-organismos (HASKARD; BINNION; AHOKAS, 2000) e redução enzimática (DE OLIVEIRA; BONATTO; HENRIQUES, 2010), podem estar envolvidos.

A adição de flavonas e isoflavonas levaram à diminuição da formação de acrilamida durante reações de Maillard promovidas utilizando micro-ondas. A taxa de inibição foi relacionada ao número de grupos hidroxila provenientes dos antioxidantes (CHENG et al., 2015). Certos micro-organismos produzem enzimas que catalisam a síntese e a biodegradação da acrilamida. As enzimas microbianas envolvidas e produzidas por *Rhodococcus rhodochrous* incluem: hidratase nitrílica, amidase, glutamina sintetase e desidrogenase (ASTAUROVA et al., 2000; STEVENS et al., 2003). No entanto, como a acrilamida é produzida durante o processamento térmico, o uso de enzimas degradantes da acrilamida parece ser uma forma improvável de remover esse composto dos alimentos. Já as estratégias destinadas à remoção dos precursores e mudanças nas técnicas de processamento parecem ser mais eficazes em medidas preventivas contra a formação da acrilamida nos alimentos.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A potencial formação de compostos tóxicos durante o processamento de produtos cárneos consiste em uma química complexa, resultado das interações entre reagentes e condições específicas para formar NOCs, PAHs, HAA, ENA e DNMP. Dessa forma, esses compostos são os principais produtos químicos de interesse toxicológico em carnes processadas. As evidências científicas compiladas por este estudo corroboram a decisão da IARC de classificar carnes processadas no Grupo I. No entanto, no futuro essa classificação deve ser pontual e considerar as diferentes categorias de produtos cárneos, bem como sua composição química e microbiológica.

Apesar do uso de conservantes ser rigorosamente revisado e regulamentado na maioria dos países, práticas abusivas e uso de espécies químicas proibidas podem aumentar a formação de compostos cancerígenos em produtos cárneos. Por outro lado, os estudos de carcinogenicidade devem ser conduzidos em níveis que correspondam à real exposição humana pelo consumo de produtos cárneos.

Métodos analíticos modernos, reprodutíveis, sensíveis e altamente confiáveis são ferramentas essenciais para a quantificação de compostos cancerígenos em produtos

cárneos. A regulamentação deve ser aprimorada estabelecendo limites de resíduos específicos para outros compostos nocivos que não atribuídas a nitrosaminas e HPAs em produtos cárneos, como DNMP e ENA. Além disso, o escopo dos programas oficiais de monitoramento e controle de qualidade por agências e indústrias reguladoras deve abranger os compostos cancerígenos, em vez de ser uma avaliação de conformidade apenas com o uso de aditivos.

Atualmente, muitas abordagens inovadoras, seletivas e eficazes têm sido relatadas na literatura para a bioconversão de contaminantes em alimentos, principalmente pelo uso de processos fermentativos e enzimáticos. No entanto, o uso de antioxidantes ainda é a abordagem mais usada devido à sua praticidade, baixo custo e eficácia.

Embora relacionados a muitas doenças, a carne e seus derivados ainda são considerados muito importantes para uma dieta equilibrada devido à sua riqueza nutricional. A relevância da participação de produtos cárneos em implicações para a saúde não deve ser considerada isoladamente, mas em relação a outros alimentos. Além disso, os riscos à saúde associados ao consumo de carne processada não se devem apenas ao uso de aditivos durante o processamento, pois compostos perigosos também podem ser formados durante a digestão no trato gastrointestinal, sem uma ligação clara a um ou outro aditivo. Assim, ainda são necessários mais estudos para esclarecer o risco aumento de desenvolver cânceres devido ao consumo de produtos cárneos, e elucidar os principais mecanismos de carcinogenicidade. Contudo, tais compostos não podem ser negligenciados.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, O. et al. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. *Food Chemistry*, v. 246, p. 6-17, 2018.
- ABOU-ARAB, A. et al. Persistence of Some Lactic Acid Bacteria As Affected By Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Microbiology & Experimentation*, v. 2, n. 5, 2015.
- AHN, H. et al. Monitoring of Nitrite and N-Nitrosamine Levels in Irradiated Pork Sausage. *Journal of Food Protection*, v. 65, n. 9, p. 1493-1497, 2002.
- AL-RASHDAN, A. et al. Determination of the Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Toasted Bread Using Gas Chromatography Mass Spectrometry. *International Journal of Analytical Chemistry*, v. 2010, p. 1-8, 2010.
- ALAHAKOON, A. et al. Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. *Trends in Food Science & Technology*, v. 45, n. 1, p. 37-49, 2015.
- ANDREWS, A.; FORNWALD, J.; LIJINSKY, W. Nitrosation and mutagenicity of some amine drugs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 52, n. 2, p. 237-244, 1980.
- ASTAUROVA, O. et al. Adaptation of *Rhodococcus rhodochrous* M8, a producer of acrylamide, to changes in ammonium concentration in the growth medium. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 36, n. 1, p. 15-18, 2000.
- AUGUSTIN, M. et al. Role of food processing in food and nutrition security. *Trends in Food Science & Technology*, v. 56, p. 115-125, 2016.
- BACILA, D. et al. Current research, regulation, risk, analytical methods and monitoring results for nicarbazin in chicken meat: A perspective review. *Food Research International*, v. 99, p. 31-40, 2017.
- BANERJEE, T.; GIRI, A. Effects of sorbic acid and sorbic acid-nitrite in vivo on bone marrow chromosomes of mice. *Toxicology Letters*, v. 31, n. 2, p. 101-106, 1986.
- BANSAL, V.; KIM, K. Review of PAH contamination in food products and their health hazards. *Environment International*, v. 84, p. 26-38, 2015.
- BARTKIENE, E. et al. The impact of lactic acid bacteria with antimicrobial properties on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and biogenic amines in cold smoked pork sausages. *Food Control*, v. 71, p. 285-292, 2017.
- BARZEGAR, F.; KAMANKESH, M.; MOHAMMADI, A. Heterocyclic aromatic amines in cooked food: A review on formation, health risk-toxicology and their analytical techniques. *Food Chemistry*, v. 280, p. 240-254, 2019.

BERTINETTI, I. et al. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rice subjected to drying with different fuels plus temperature, industrial processes and cooking. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 66, p. 109-115, 2018.

BHAGAN, S. et al. Exposure Estimate for Semicarbazide from the Use of Azodicarbonamide in Bread for the U.S. Population. National Meeting of the American Chemical Society. San Diego, United States, 2016.

BINSTOK, G. et al. Sorbate–nitrite reactions in meat products. *Food Research International*, v. 31, n. 8, p. 581-585, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 272, de 14 de março de 2019. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Brasília: Diário Oficial da União (Seção 1), ed. 52, p. 194.

BULUSHI, I. et al. 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.

BUTLER, A. Nitrites and nitrates in the human diet: Carcinogens or beneficial hypotensive agents?. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 167, p. 105-107, 2015.

BUŁA, M. et al. Formation of heterocyclic aromatic amines in relation to pork quality and heat treatment parameters. *Food Chemistry*, v. 276, p. 511-519, 2019.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, v. 71, p. 107-120, 2018.

CASCELLA, M. et al. Dissecting the mechanisms and molecules underlying the potential carcinogenicity of red and processed meat in colorectal cancer (CRC): an overview on the current state of knowledge. *Infectious Agents and Cancer*, v. 13, n. 1, 2018.

CFIA (Canadian Food Inspection Agency). Animal Products Food of Animal Origin. Livestock and meat processing: nitrosamines. Ottawa, Canada: Minister of Public Works and Government Services, 2018. Disponível em: < <http://www.inspection.gc.ca/english/anima/meavia/mmopmmhv/hap5/5.4-7e.shtml>>. Acesso em: 02 out. 2018.

CEPA (Canadian Environmental Protection Act). Priority Substances List Assessment Report: N-Nitrosodimethylamine. Ottawa, Canada: Minister of Public Works and Government Services, 1999.

CEPA (CANADIAN ENVIRONMENTAL PROTECTION ACT). *Priority substances list assessment report: N-nitrosodimethylamine (NDMA) / Co-published by Health Canada*. Ottawa, Ontario: Environment Canada, 2001.

- CHAPIN, R. The Reproductive and Neural Toxicities of Acrylamide and Three Analogues in Swiss Mice, Evaluated Using the Continuous Breeding Protocol. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 27, n. 1, p. 9-24, 1995.
- CHAPPEL, C.; HOWELL, J. Caramel colours—A historical introduction. *Food and Chemical Toxicology*, v. 30, n. 5, p. 351-357, 1992.
- CHEN, D. et al. Parallel reaction monitoring to improve the detection performance of carcinogenic 4-methylimidazole in food by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry coupled with dispersive micro solid-phase extraction. *Food Control*, v. 88, p. 1-8, 2018.
- CHEN, L. et al. Simultaneous Detection of Azodicarbonamide and the Metabolic Product Semicarbazide in Flour by Capillary Electrophoresis. *Food Analytical Methods*, v. 9, n. 5, p. 1106-1111, 2015.
- CHENG, J. et al. Antioxidant-capacity-based models for the prediction of acrylamide reduction by flavonoids. *Food Chemistry*, v. 168, p. 90-99, 2015.
- COSTA, L. Biomarker research in neurotoxicology: the role of mechanistic studies to bridge the gap between the laboratory and epidemiological investigations. *Environmental Health Perspectives*, v. 104, n. suppl 1, p. 55-67, 1996.
- CREWS, C. The determination of N-nitrosamines in food. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, v. 2, n. 1, p. 2-12, 2010.
- CZAJKOWSKA-MYSŁEK, A.; LESZCZYŃSKA, J. Risk assessment related to biogenic amines occurrence in ready-to-eat baby foods. *Food and Chemical Toxicology*, v. 105, p. 82-92, 2017.
- DE MEY, E. et al. Volatile N-nitrosamines in meat products: Potential precursors, influence of processing, and mitigation strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 57, n. 13, p. 2909-2923, 2015.
- DE MEY, E. et al. A Study of the Effects of pH and Water Activity on the N-Nitrosopiperidine Formation in a Protein-Based Liquid System. *Food and Bioprocess Technology*, v. 7, n. 10, p. 2978-2985, 2014.
- DE OLIVEIRA, I.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. Nitroreductases: enzymes with environmental, biotechnological and clinical importance. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2. ed. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2010. p. 1008-1019.
- DELLA BETTA, F. et al. A sub-minute CZE method to determine nitrate and nitrite in meat products: An alternative for routine analysis. *Meat Science*, v. 119, p. 62-68, 2016.

- DEMIROK, E.; KOLSARICI, N. Effect of green tea extract and microwave pre-cooking on the formation of acrylamide in fried chicken drumsticks and chicken wings. *Food Research International*, v. 63, p. 290-298, 2014.
- DING, X. et al. Simultaneous determination of ten preservatives in ten kinds of foods by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chemistry*, v. 181, p. 207-214, 2015.
- DOMAŃSKA, K.; KOWALSKI, B. Occurrence of volatile N-nitrosamines in Polish processed meat products. *Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy*, v. 47, n. 2, p. 207-214, 2003.
- DOMINGO, J.; NADAL, M. Carcinogenicity of consumption of red meat and processed meat: A review of scientific news since the IARC decision. *Food and Chemical Toxicology*, v. 105, p. 256-261, 2017.
- DROSINOS, E. et al. Inhibitory effect of organic acid salts on spoilage flora in culture medium and cured cooked meat products under commercial manufacturing conditions. *Meat Science*, v. 73, n. 1, p. 75-81, 2006.
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. *EFSA Journal* v. 6, n. 8, 2008.
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the reevaluation of caramel colours (E 150a, b, c, and d) as food additives. *EFSA Journal* v. 9, n. 13, 2011.
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives. *EFSA Journal* v. 13, n. 6, 2015a.
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Panel on Contaminants in the Food Chain Scientific Opinion on nitrofurans and their metabolites in food. *EFSA Journal* v. 13, n. 6, 2015b.
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Panel on Contaminants in the Food Chain. Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal* v. 13, n. 6, 2015c.
- EL-ZAKHEM NAOUS, G. et al. Carcinogenic and neurotoxic risks of acrylamide consumed through caffeinated beverages among the lebanese population. *Chemosphere*, v. 208, p. 352-357, 2018.
- EU (European Union). Commission Directive 2004/1/EC of 6 January 2004 amending Directive 2002/72/EC as regards the suspension of the use of azodicarbonamide as blowing agent. *Off. J. Europ. Comm.* v. 7 n. 45, 2004.

EU (European Union). Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 laying down specifications for food additives listed in Annexes II to Regulation (EC) No. 1333/2008 of the European Parliament and of the Council. Off. J. Europ. Comm. No. L 295:1, 2011a. Disponível em: < <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1129&from=EN> >. Acesso em: 12 fev. 2018.

EU (European Union). Commission Regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs of the European Parliament and of the Council. Off. J. Europ. Comm. No. L 215:4, 2011b. Disponível em: < https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg835_2011.pdf > Acesso em: 12 fev. 2018.

EU (European Union). Commission Regulation (EU) No 231/2012 of 9 March 2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) No. 1333/2008 of the European Parliament and of the Council. Off. J. Europ. Comm. No. L 83:1, 2012. Disponível em: < <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0231&from=EN> >. Acesso em: 12 fev. 2018.

JECFA (Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Committee on Food Additives). Codex Alimentarius Commission. *General standard for food additives (Codex Stan 192-1995)*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1995. Disponível em: <http://www.fao.org/gsfonline/docs/CXS_192e.pdf>. Acesso em: 17 set. 2019.

FASANO, E. et al. Profiling, distribution and levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoked plant and animal foods. *Food Control*, v. 59, p. 581-590, 2016.

FDA (Food and Drug Administration). Teratologic evaluation of FDA 73-4, potassium sorbate, sorbistat, in mice and rats. PB-245520. National Technical Information Service, Department of Commerce. Springfield, United States: Research Laboratories Inc., 1975.

FENG, X. et al. Influence of sodium nitrite on protein oxidation and nitrosation of sausages subjected to processing and storage. *Meat Science*, v. 116, p. 260-267, 2016.

FIDDLER, W. et al. Nitrosamine Formation in Processed Hams as Related to Reformulated Elastic Rubber Netting. *Journal of Food Science*, v. 63, n. 2, p. 276-278, 2008.

FIERENS, T. et al. Caramel colour and process contaminants in foods and beverages: Part II – Occurrence data and exposure assessment of 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole (THI) and 4-methylimidazole (4-MEI) in Belgium. *Food Chemistry*, v. 255, p. 372-379, 2018.

FOER, J. *Eating animals*. London: Penguin Books Ltd., 2011.

FUCHS, S. et al. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 4, p. 1398-1407, 2008.

GALLAHER, S.; TRUDO, D. Nutrition and Colon Cancer Trudo. In: COULSTON, A. et al. (Ed.). *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*. 4. ed. [S.l.]: ELSEVIER ACADEMIC Press, 2017. p. 787-807.

GHASEMI, A.; JEDDI, S. Anti-obesity and anti-diabetic effects of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, v. 70, p. 9-24, 2017.

GIBIS, M.; WEISS, J. Inhibitory effect of cellulose fibers on the formation of heterocyclic aromatic amines in grilled beef patties. *Food Chemistry*, v. 229, p. 828-836, 2017.

GLADWIN, M. et al. The emerging biology of the nitrite anion. *Nature Chemical Biology*, v. 1, n. 6, p. 308-314, 2005.

GLÓRIA, M.; BARBOUR, J.; SCANLAN, R. Volatile Nitrosamines in Fried Bacon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 5, p. 1816-1818, 1997.

GOLON, A.; KUHNERT, N. Unraveling the Chemical Composition of Caramel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 12, p. 3266-3274, 2012.

GUO, J. et al. Relationships between acrylamide and glycidamide hemoglobin adduct levels and allergy-related outcomes in general US population, NHANES 2005–2006. *Environmental Pollution*, v. 225, p. 506-513, 2017.

HANNUKSELA, M.; HAAHTELA, T. Hypersensitivity reactions to food additives. *Allergy*, v. 42, n. 8, p. 561-575, 1987.

HAMZALI OĞLU, A.; MOGOL, B.; GÖKMEN, V. Acrylamide: An Overview of the Chemistry and Occurrence in Foods. *Encyclopedia of Food Chemistry*, p. 492-499, 2019.

HANSEN, T.; TANNENBAUM, S.; ARCHER, M. Identification of nonenylnitrolic acid in corn treated with nitrous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 29, n. 5, p. 1008-1011, 1981.

HARTMAN, P. Review: Putative mutagens and carcinogens in foods. II: Sorbate and sorbate-nitrite interactions. *Environmental Mutagenesis*, v. 5, n. 2, p. 217-222, 1983.

HASKARD, C.; BINNION, C.; AHOKAS, J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*, v. 128, n. 1, p. 39-49, 2000.

HAYATSU, H.; CHUNG, K.; NAKAJIMA, T. Generation of mutagenic compound (s) by a reaction between sorbic acid and nitrite. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, v. 30, p. 417-419, 1975.

HERRAIZ, T.; GALISTEO, J. Nitrosative deamination of 2'-deoxyguanosine and DNA by nitrite, and antinitrosating activity of β -carboline alkaloids and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, v. 112, p. 282-289, 2018.

HERRMANN, S.; DUEDAHL-OLESEN, L.; GRANBY, K. Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation. *Journal of Chromatography A*, v. 1330, p. 20-29, 2014.

HERRMANN, S.; DUEDAHL-OLESEN, L.; GRANBY, K. Occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in processed meat products and the role of heat treatment. *Food Control*, v. 48, p. 163-169, 2015.

HERRMANN, S. et al. Dietary exposure to volatile and non-volatile N-nitrosamines from processed meat products in Denmark. *Food and Chemical Toxicology*, v. 80, p. 137-143, 2015.

HERRMANN, S.; GRANBY, K.; DUEDAHL-OLESEN, L. Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages. *Food Chemistry*, v. 174, p. 516-526, 2015.

HOENICKE, K. et al. Formation of semicarbazide (SEM) in food by hypochlorite treatment: is SEM a specific marker for nitrofurazone abuse?. *Food Additives and Contaminants*, v. 21, n. 6, p. 526-537, 2004.

HOGERVORST, J. et al. The carcinogenicity of dietary acrylamide intake: A comparative discussion of epidemiological and experimental animal research. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 40, n. 6, p. 485-512, 2010.

HONIKEL, K. 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, H. et al. Associations between exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and glucose homeostasis as well as metabolic syndrome in nondiabetic adults. *Science of The Total Environment*, v. 505, p. 56-64, 2015.

IARC (International Agency for Research on Cancer). *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans: Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs. Suplemento 7 Vol. 1-12*, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Lyon, France: Who Press, 1987. 449p. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/Suppl7.pdf>>. Acesso em 09 nov. 2018.

IARC (International Agency for Research on Cancer). *Acrylamide. Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-Water. Vol. 60*, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Lyon,

France: Who Press, 1994. 389-433p. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono60-16.pdf>>. Acesso em 09 nov. 2018.

IARC (International Agency for Research on Cancer). *SOME THYROTROPIC AGENTS*. Vol. 79, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Lyon, France: Who Press, 2001. 464p. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono79.pdf>>. Acesso em 09 nov. 2018.

IARC (International Agency for Research on Cancer). *Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins*. Vol. 94, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Lyon, France: Who Press, 2010a. 611p. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono94.pdf>>. Acesso em 09 nov. 2018.

IARC (International Agency for Research on Cancer). *4-Methylimidazole. Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-Water*. Vol. 101, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Lyon, France: Who Press, 2011. 611p. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/mono101-015.pdf>>. Acesso em 09 nov. 2018.

IARC (International Agency for Research on Cancer). *Monographs Evaluate Consumption of Red Meat and Processed Meat*. Vol. 114, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Lyon, France: Who Press, 2015. 511p. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono114.pdf>>. Acesso em 09 nov. 2018.

IARC (International Agency for Research on Cancer). *Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures*. Vol. 92, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Lyon, France: Who Press, 2010b. 511p. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf>>. Acesso em 09 nov. 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). *Standard ISO/IEC 17025:2017: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Genève, 2017.

JACOBS, G. et al. Caramel colour and process by-products in foods and beverages: Part I – Development of a UPLC-MS/MS isotope dilution method for determination of 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole (THI), 4-methylimidazole (4-MEI) and 2-methylimidazol (2-MEI). *Food Chemistry*, v. 255, p. 348-356, 2018.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Monographs 11: Compendium of Food Additive Specifications - Caramel colours, expert Committee on Food Additives. Rome, Italy: FAO, 2011. 139p. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/i2358e/i2358e00.pdf>> Acesso em 09 nov. 2018.

- JIANG, L. et al. Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *Toxicology in Vitro*, v. 21, n. 8, p. 1486-1492, 2007.
- JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; CARBALLO, J.; COFRADES, S. Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science*, v. 59, n. 1, p. 5-13, 2001.
- JUHLIN, L. Recurrent urticaria: clinical investigation of 330 patients. *British Journal of Dermatology*, v. 104, n. 4, p. 369-381, 1981.
- KADA, T. DNA-damaging products from reaction between sodium nitrite and sorbic acid. *Annu. Rep. Nat. Inst. Genet.*, 1974.v. 24, p. 43-44, 1974.
- KARIM, F.; SMITH, J. Detection and Quantification of 4(5)-Methylimidazole in Cooked Meat. *Journal of Food Science*, v. 80, n. 2, p. T465-T471, 2015.
- KIM, D. et al. Estimation of the soil hazardous concentration of methylparaben using a species sensitivity approach. *Environmental Pollution*, v. 242, p. 1002-1009, 2018.
- KITADA, K.; SUDA, Y.; TAKENAKA, N. Acceleration and Reaction Mechanism of the N-Nitrosation Reaction of Dimethylamine with Nitrite in Ice. *The Journal of Physical Chemistry A*, v. 121, n. 29, p. 5383-5388, 2017.
- KITO, Y.; NAMIKI, M.; TSUJI, K. A new n-nitropyrrole: 1,4-Dinitro-2-methylpyrrole, formed by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite. *Tetrahedron*, v. 34, n. 5, p. 505-508, 1978.
- KOBAYASHI, J. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of N-nitroso compounds: A review. *Nitric Oxide*, v. 73, p. 66-73, 2018.
- KOČAK, D. et al. Determination of volatile nitrosamines in grilled lamb and vegetables using comprehensive gas chromatography – Nitrogen chemiluminescence detection. *Food Chemistry*, v. 135, n. 4, p. 2215-2220, 2012.
- KOMAROVA, N.; VELIKANOV, A. Determination of volatile N-nitrosamines by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 56, n. 4, p. 359-363, 2001.
- KRYCH-MADEJ, J.; GEBICKA, L. Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetics studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 171, p. 10-17, 2017.
- KWON, J. Semicarbazide: Natural occurrence and uncertain evidence of its formation from food processing. *Food Control*, v. 72, p. 268-275, 2017.
- LAMBERT, R. et al. Theory of antimicrobial combinations: biocide mixtures - synergy or addition?. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, n. 4, p. 747-759, 2003.

LEDESMA, E.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Contamination of meat products during smoking by polycyclic aromatic hydrocarbons: Processes and prevention. *Food Control*, v. 60, p. 64-87, 2016.

LEE, J. et al. Effects of grilling procedures on levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meats. *Food Chemistry*, v. 199, p. 632-638, 2016.

LI, B. et al. Analytical capabilities of mass spectrometry imaging and its potential applications in food science. *Trends in Food Science & Technology*, v. 47, p. 50-63, 2016.

LIJINSKY, W. N-Nitroso compounds in the diet. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 443, n. 1-2, p. 129-138, 1999.

LINS, E.; CONCEIÇÃO, E.; MAURICIO, A. Evolution of a residue laboratory network and the management tools for monitoring its performance. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 29, n. 4, p. 490-496, 2012.

LORENZO, J.; MUNEKATA, P.; 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.

LU, F.; KUHNLE, G.; CHENG, Q. The effect of common spices and meat type on the formation of heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in deep-fried meatballs. *Food Control*, v. 92, p. 399-411, 2018.

MAGEE, P.; BARNES, J. The Production of Malignant Primary Hepatic Tumours in the Rat by Feeding Dimethylnitrosamine. *British Journal of Cancer*, v. 10, n. 1, p. 114-122, 1956.

MALARUT, J.; VANGNAI, K. Influence of wood types on quality and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of smoked sausages. *Food Control*, v. 85, p. 98-106, 2018.

MAMUR, S. et al. Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes?. *Toxicology in Vitro*, v. 24, n. 3, p. 790-794, 2010.

Mandal, P., Rai, A., Mishra, S., Tripathi, A., & Das, M. (2018). Mutagens in Food. In *Mutagenicity: Assays and Applications*. Chapter 7, 133-160. Elsevier Inc.

MASUDA, M. et al. Formation of N-Nitrosamines and N-Nitramines by the Reaction of Secondary Amines with Peroxynitrite and Other Reactive Nitrogen Species: Comparison with Nitrotyrosine Formation. *Chemical Research in Toxicology*, v. 13, n. 4, p. 301-308, 2000.

MESTANKOVA, H. et al. Development of mutagenicity during degradation of N-nitrosamines by advanced oxidation processes. *Water Research*, v. 66, p. 399-410, 2014.

MICHALAK, J. et al. Effect of different home-cooking methods on acrylamide formation in pre-prepared croquettes. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 56, p. 134-139, 2017.

MOGOL, B.; GÖKMEN, V. Thermal process contaminants: acrylamide, chloropropanols and furan. *Current Opinion in Food Science*, v. 7, p. 86-92, 2016.

MOLOGNONI, L. et al. The role of measurement uncertainty in the conformity assessment of the chemical composition of feeds. *Microchemical Journal*, v.131, p.79-91, 2017.

MOLOGNONI, L. et al. Development of a new analytical tool for assessing the mutagen 2-methyl-1,4-dinitro pyrrole in meat products by LC-ESI-MS/MS. *Talanta*, v. 185, p. 151-159, 2018a.

MOLOGNONI, L. et al. A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. *Talanta*, v. 178, p. 1053-1066, 2018b.

MOTTIER, P. et al. Process-induced formation of imidazoles in selected foods. *Food Chemistry*, v. 228, p. 381-387, 2017.

MUKHERJEE, A. et al. Sister chromatid exchanges and micronuclei formations induced by sorbic acid and sorbic acid-nitrite in vivo in mice. *Toxicology Letters*, v. 42, n. 1, p. 47-53, 1988.

MULDER, P.; BEUMER, B.; VAN RHIJN, J. The determination of biurea: A novel method to discriminate between nitrofurazone and azodicarbonamide use in food products. *Analytica Chimica Acta*, v. 586, n. 1-2, p. 366-373, 2007.

MÜNZNER, R.; GUIGAS, C.; RENNER, H. Re-examination of potassium sorbate and sodium sorbate for possible genotoxic potential. *Food and Chemical Toxicology*, v. 28, n. 6, p. 397-401, 1990.

NAKAMURA, M.; KATOH, K.; KAWABATA, T. Precursors to Nitrosopyrrolidine and Nitrosopiperidine in Black Pepper Treated with Nitrous Acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 45, n. 5, p. 1257-1259, 1981.

NAMIKI, M.; KADA, T. Formation of ethylnitrolic acid by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 39, n. 6, p. 1335-1336, 1975.

NAMIKI, M. et al. Formation of mutagens by sorbic acid-nitrite reaction: effects of reaction conditions on biological activities. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 73, n. 1, p. 21-28, 1980.

NAMIKI, M. et al. Chemical aspects of mutagen formation by sorbic acid-sodium nitrite reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 29, n. 2, p. 407-411, 1981.

NEDELJKO, P.; TUREL, M.; LOBNIK, A. Hybrid sol-gel based sensor layers for optical determination of biogenic amines. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 246, p. 1066-1073, 2017.

NERÍN, C.; AZNAR, M.; CARRIZO, D. Food contamination during food process. *Trends in Food Science & Technology*, v. 48, p. 63-68, 2016.

NTP (National Toxicology Program). Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of 4-methylimidazole (CAS NO. 822-36-6) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). New York, USA. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2007. 278p. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr535.pdf> Acesso em 02 out. 2018.

OEHHA (Office of Environmental Health Hazard Assessment). No Significant Risk Level (NSRL) for the Proposition 65 Carcinogen 4- Methylimidazole. 2012. Disponível: <<https://oehha.ca.gov/media/downloads/proposition-65/chemicals/1007114meifindings.pdf>> Acesso em 08 nov. 2018.

OHTSUKI, T. et al. Absolute quantification for benzoic acid in processed foods using quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Talanta*, v. 99, p. 342-348, 2012a.

OHTSUKI, T. et al. Absolute quantitative analysis for sorbic acid in processed foods using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, v. 734, p. 54-61, 2012b.

OLATUNJI, O. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs] in processed meat products using gas chromatography – Flame ionization detector. *Food Chemistry*, v. 156, p. 296-300, 2014.

OSAWA, T.; NAMIKI, M. Mutagen Formation in the Reaction of Nitrite with the Food Components Analogous to Sorbic Acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 46, n. 9, p. 2299-2304, 1982.

OSAWA, T. et al. Desmutagenic action of food components on mutagens formed by the sorbic acid/nitrite reaction. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 50, n. 8, p. 1971-1977, 1986.

PEREIRA, P.; VICENTE, A. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, v. 93, n. 3, p. 586-592, 2013.

PÉREZ-PRIOR, M. et al. Reactivity of Some Products Formed by the Reaction of Sorbic Acid with Sodium Nitrite: Decomposition of 1,4-Dinitro-2-methyl pyrrole and

Ethylnitrolic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 24, p. 11824-11829, 2008.

PÉREZ-PRIOR, M. et al. Sorbate–Nitrite Interactions: Acetonitrile Oxide as an Alkylating Agent. *Chemical Research in Toxicology*, v. 22, n. 7, p. 1320-1324, 2009a.

PÉREZ-PRIOR, M. et al. Solvent effects in the decomposition reaction of some products formed by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite: 1,4-dinitro-2-methyl pyrrole and ethylnitrolic acid. *Journal of Physical Organic Chemistry*, v. 22, n. 5, p. 418-424, 2009b.

PÉREZ-PRIOR, M. et al. Reactivity of the Mutagen 1,4-Dinitro-2-methyl pyrrole as an Alkylating Agent. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 75, n. 5, p. 1444-1449, 2010.

PLATA-GUERRERO, R.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Determination of Reducing Sugar and Asparagine in Potatoes. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 32, n. 17, p. 2556-2568, 2009.

POURAZRANG, H.; MOAZZAMI, A.; BAZZAZ, B. Inhibition of mutagenic *N*-nitroso compound formation in sausage samples by using l-ascorbic acid and α -tocopherol. *Meat Science*, v. 62, n. 4, p. 479-483, 2002.

PRESTER, L. Biogenic amines in ready-to-eat foods. *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods*, p. 397-416, 2016.

ROBACH, M.; STATELER, C. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Potassium Sorbate in Combination with Sodium Chloride, Tertiary Butylhydroquinone, Butylated Hydroxyanisole or Ethylenediamine Tetraacetic Acid. *Journal of Food Protection*, v. 43, n. 3, p. 208-211, 1980.

ROBACH, M.; SOFOS, J. Use of Sorbates in Meat Products, Fresh Poultry and Poultry Products: A Review. *Journal of Food Protection*, v. 45, n. 4, p. 374-383, 1982.

SARAJI, M.; JAVADIAN, S. Single-drop microextraction combined with gas chromatography-electron capture detection for the determination of acrylamide in food samples. *Food Chemistry*, v. 274, p. 55-60, 2019.

SEBRANEK, J. et al. Beyond celery and starter culture: Advances in natural/organic curing processes in the United States. *Meat Science*, v. 92, n. 3, p. 267-273, 2012.

SERRANO-GONZÁLEZ, M. et al. Biotransformation and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by microbial metabolism and their interaction. *Defence Technology*, v. 14, n. 2, p. 151-164, 2018.

SHI, C. et al. Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *Food Control*, v. 71, p. 10-16, 2017.

- SHIM, S. et al. Consumers' knowledge and safety perceptions of food additives: Evaluation on the effectiveness of transmitting information on preservatives. *Food Control*, v. 22, n. 7, p. 1054-1060, 2011.
- SINDELAR, J.; MILKOWSKI, A. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide*, v. 26, n. 4, p. 259-266, 2012.
- SINGH, L.; VARSHNEY, J.; AGARWAL, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food. *Food Chemistry*, v. 199, p. 768-781, 2016.
- SOFOS, J. Antimicrobial agents. In: MAGA, J.; TU, A. *Food additive toxicology*. 1. ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1995. p. 501-529.
- SOFOS, J. Improved Cooking Yields of Meat Batters Formulated with Potassium Sorbate and Reduced Levels of NaCl. *Journal of Food Science*, v. 50, n. 6, p. 1571-1575, 1985.
- SOFOS, J.; BUSTA, F.; ALLEN, C. Botulism Control by Nitrite and Sorbate in Cured Meats: A Review. *Journal of Food Protection* v. 42, n. 9, p. 739-770, 1979.
- SONG, P.; WU, L.; GUAN, W. Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Nutrients*, v. 7, n. 12, p. 9872-9895, 2015.
- STEVENS, J. et al. Chaperone-assisted expression, purification, and characterization of recombinant nitrile hydratase NII from *Comamonas testosteroni*. *Protein Expression and Purification*, v. 29, n. 1, p. 70-76, 2003.
- TAKAHASHI, M. et al. Chronic toxicity and carcinogenicity of semicarbazide hydrochloride in Wistar Hannover GALAS rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 73, p. 84-94, 2014.
- TAORMINA, P. Implications of Salt and Sodium Reduction on Microbial Food Safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 50, n. 3, p. 209-227, 2010.
- TENG, H. et al. Inhibitory effect of the extract from *Sonchus oleraleu* on the formation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines during the pork cooking. *Food and Chemical Toxicology*, v. 129, p. 138-143, 2019.
- TENGILIMOGLU-METIN, M.; KIZIL, M. Reducing effect of artichoke extract on heterocyclic aromatic amine formation in beef and chicken breast meat. *Meat Science*, v. 134, p. 68-75, 2017.
- THOMAS, L.; DELVES-BROUGHTON, J. Preservatives: Permitted Preservatives - Sorbic Acid. In: BATT, C.; TORTORELLO, M. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 102-107.
- TREVISAN, A. et al. Influence of home cooking conditions on Maillard reaction products in beef. *Food Chemistry*, v. 196, p. 161-169, 2016.

USA (United States of America). Code of Federal Regulations. Title 9 - Animals and Animal Products. Chapter III - Food Safety and Inspection Service, Department of Agriculture. Subchapter E - Regulatory Requirements Under the Federal Meat Inspection Act and the Poultry Products Inspection Act. 2012. Disponível em: <<https://www.govinfo.gov>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Water Topics. Appendix A to 40 CFR Part 423. 2010. Disponível em: <<http://www.epa.gov/waterscience/methods/pollutants.htm>>. Acesso em 13 fev. 2018.

VIEGAS, O. et al. Effect of Beer Marinades on Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Charcoal-Grilled Pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 12, p. 2638-2643, 2014.

VITAGLIONE, P.; FOGLIANO, V. Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. *Journal of Chromatography B*, v. 802, n. 1, p. 189-199, 2004.

VOLLMUTH, T. Caramel color safety – An update. *Food and Chemical Toxicology*, v. 111, p. 578-596, 2018.

WALKER, R. Toxicology of sorbic acid and sorbates. *Food Additives and Contaminants*, v. 7, n. 5, p. 671-676, 1990.

WANG, J. et al. Composite of PAH-degrading endophytic bacteria reduces contamination and health risks caused by PAHs in vegetables. *Science of the Total Environment*, v. 598, p. 471-478, 2017.

WANG, W.; KANNAN, K. Fate of Parabens and Their Metabolites in Two Wastewater Treatment Plants in New York State, United States. *Environmental Science & Technology*, v. 50, n. 3, p. 1174-1181, 2016.

WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. Novel Aspects of Dietary Nitrate and Human Health. *Annual Review of Nutrition*, v. 33, n. 1, p. 129-159, 2013.

WHO (World Health Organization). Food and Drug Administration. Acrylamide. In: Summary And Conclusions of the Sixty-Fourth meeting. Joint FAO/Who Expert C, Rome, Italy: Who Press, 2005. 47p. Disponível em: <ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa64_summary.pdf> Acesso em 07 nov. 2018.

WHO (World Health Organization). Consultation on Health Implications of Acrylamide in Food. Health Implications of Acrylamide in Food: Report of a Joint FAO/WHO Consultation. Genève, Switzerland: 2002.

WHO (World Health Organization). Food safety risk analysis: a guide for national food safety authorities. Rome, Italy: FAO, 2006a. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/a0822e/a0822e00.htm>>. Acesso em 07 nov. 2018.

WHO (World Health Organization. Reducing salt intake in populations: report of a WHO forum and technical meeting. Rome, Italy: FAO, 2006b. Disponível em: <<http://www.who.int/dietphysicalactivity/reducingsaltintake EN.pdf>>. Acesso em 09 nov. 2018.

WÓJCIAK, K.; KARWOWSKA, M.; DOLATOWSKI, Z. Use of acid whey and mustard seed to replace nitrites during cooked sausage production. *Meat Science*, v. 96, n. 2, p. 750-756, 2014.

YANG, D. et al. Rapid determination of biogenic amines in cooked beef using hyperspectral imaging with sparse representation algorithm. *Infrared Physics & Technology*, v. 86, p. 23-34, 2017.

YOSHIMURA, Y. et al. Significant advancement of mass spectrometry imaging for food chemistry. *Food Chemistry*, v. 210, p. 200-211, 2016.

YU, M. et al. Semicarbazide disturbs the reproductive system of male zebrafish (*Danio rerio*) through the GABAergic system. *Reproductive Toxicology*, v. 73, p. 149-157, 2017.

YURCHENKO, S.; MÖLDER, U. Volatile N-Nitrosamines in various fish products. *Food Chemistry*, v. 96, n. 2, p. 325-333, 2006.

ZAMORA, M.; ZARITZKY, N. Potassium Sorbate Inhibition of Microorganisms Growing on Refrigerated Packaged Beef. *Journal of Food Science*, v. 52, n. 2, p. 257-262, 1987.

ZELINKOVA, Z.; WENZL, T. The Occurrence of 16 EPA PAHs in Food – A Review. *Polycyclic Aromatic Compounds*, v. 35, n. 2-4, p. 248-284, 2015.

ZHANG, H. et al. Analysis of the monitoring status of residual nitrite in meat products in China from 2000 to 2011. *Meat Science*, v. 136, p. 30-34, 2018.

ZHAO, X. et al. TBHQ and peanut skin inhibit accumulation of PAHs and oxygenated PAHs in peanuts during frying. *Food Control*, v. 75, p. 99-107, 2017.

**CAPÍTULO II - UMA FERRAMENTA MULTIPROPÓSITO PARA A
INSPEÇÃO DE ALIMENTOS: DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
CONSERVANTES E AMINAS BIOGÊNICAS EM CARNES, PEIXES E
DERIVADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTOMETRIA DE MASSAS**

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

No presente capítulo foi demonstrado o desenvolvimento, validação e estudo das incertezas de uma ferramenta analítica com caráter multipropósito, empregando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). A inovação química foi demonstrada com a aplicabilidade do método em diferentes produtos cárneos e pescados gerando resultados surpreendentes para a Ciência dos Alimentos. Foi o primeiro método reportado na literatura capaz de analisar simultaneamente diversas classes de aminas biogênicas e conservantes em alimentos, demonstrando um relação importante sobre as características físico-químicas no controle desses alimentos. Além disso, foi a primeira ferramenta necessária para a construção desta tese.

A inovação química proposta por esse capítulo foi reconhecida com a publicação no periódico *Talanta*.

Artigo publicado:

MOLOGNONI, L. et al. A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. *Talanta*, v. 178, p. 1053-1066, 2018. doi: 10.1016/j.talanta.2017.08.081.

RESUMO

Este capítulo descreve um método inovador, rápido e de caráter multipropósito para a inspeção de produtos cárneos, pescados e derivados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Uma extração sólido-líquido utilizando mistura de solventes orgânicos seguida da partição à baixa temperatura foi aplicada a 17 analitos de características físico-químicas distintas, incluindo moléculas grandes (3,5 kDa) e pequenas (80 Da). A separação cromatográfica utilizando fase estacionária di-isopropil-3-aminopropil silano ligado à sílica hidroxilada foi aplicada com sucesso na separação de todos os analitos em até 10 min. A validação do método ficou em conformidade com as diretrizes da Decisão 2002/657/UE. As faixas de trabalho compreenderam de 1,25 - 10,0 mg kg⁻¹ (natamicina e parabens), 2,50 - 10,0 mg kg⁻¹ (sorbato e nisina), 25,0 - 200 mg kg⁻¹ (aminas biogênicas, hexametilenotetramina, ácido benzóico e ácido láctico) e 50,0 - 400 mg kg⁻¹ (ácido cítrico). A incerteza expandida da ferramenta analítica empregando padronização interna ficou em torno de 5% e por padronização externa em 23%. A aplicabilidade do método foi verificada em 88 amostras produzidas por diferentes processamentos, resultando em recuperações e reprodutibilidades aceitáveis. Muitas irregularidades foram reveladas, corroborando a necessidade do aprimoramento dos métodos analíticos atuais. Esse método de execução simples dispensou o uso de procedimentos adicionais de extração reduzindo os custos a longo prazo. Foi demonstrado ser adequado para análises de rotina como ferramenta de triagem ou confirmação (qualitativo e quantitativo), substituindo muitos procedimentos analíticos demorados.

Palavras-chave: Avaliação de conformidade. Análise de alimentos. Integridade do alimento. Incerteza de medição. Validação de métodos. Métodos de referência. Abordagem de validação intralaboratorial.

ABSTRACT

This chapter describes an innovative fast and multipurpose method for the chemical inspection of meat and fish products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Solid-liquid extraction (with acidified methanol and acetonitrile) and low temperature partitioning were applied to 17 analytes, which included large bacteriocins (3.5 kDa) and small molecules (organic acids, heterocyclic compounds, polyene macrolides, alkyl esters of the p-hydroxybenzoic acid, aromatic, and aliphatic biogenic amines and polyamines). Chromatographic separation was achieved in 10 min, using stationary phase of di-isopropyl-3-aminopropyl silane bound to hydroxylated silica. Method validation was in accordance to Commission Decision 657/2002/CE. Linear ranges were among 1.25-10.0 mg kg⁻¹ (natamycin and parabens), 2.50-10.0 mg kg⁻¹ (sorbate and nisin), 25.0-200 mg kg⁻¹ (biogenic amines, hexamethylenetetramine, benzoic and lactic acids), and 50.0-400 mg kg⁻¹ (citric acid). Expanded measurement uncertainty (U) was estimated by single laboratory validation combined to modeling in two calculation approaches: internal (U = 5%) and external standardization (U = 23%). Method applicability was checked on 88 real samples among raw, cooked, dry fermented and cured products, yielding acceptable recoveries. Many regulatory issues were revealed, corroborating the need for enhancement of the current analytical methods. This simple execution method dispenses the use of additional procedures of extraction and, therefore, reduces costs over time. It is suitable for routine analysis as a screening or confirmatory tool for both qualitative and quantitative results, replacing many time consuming analytical procedures.

Keywords: Conformity assessment. Food analysis. Food integrity. Measurement uncertainty. Method validation. Reference methods. Single laboratory validation approach.

1 INTRODUÇÃO

A deterioração dos produtos de origem animal deve-se a uma vasta gama de reações, destacando-se as de origem microbiológica. A multiplicação de micro-organismos deteriorantes pode gerar odores desagradáveis, deformação das embalagens, perda de sabores e, de forma geral, diminuir a qualidade dos alimentos. Além de perdas econômicas para a indústria, micro-organismos patogênicos podem contaminar os alimentos oferecendo risco à saúde dos consumidores. Por outro lado, perigos de natureza química podem estar presentes, provenientes da adição irresponsável de conservantes ou substâncias decorrentes da transformação de matérias-primas.

As aminas biogênicas (AB) são compostos naturalmente presentes em baixas concentrações nos alimentos, já que constituem-se de moléculas indispensáveis ao organismo animal e vegetal (SHALABY, 1996). As aminas são produtos formados a partir da síntese da amônia, transaminação de aldoses ou cetoses, hidrólise de compostos nitrogenados e decomposição térmica. Mas a principal formação das BAs nos alimentos se deve à descarboxilação de seus aminoácidos por enzimas microbianas (TEN BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994).

Nos últimos anos, as BAs têm sido amplamente estudadas pela ciência. De fato, se pode encontrar um grande número de publicações recentes envolvendo o assunto (ORDÓÑEZ et al., 2016; HERRERO et al., 2016; NEDELJKO; TUREL; LOBNIK, 2017; REDRUELLO et al., 2017; CZAJKOWSKA-MYSŁEK; LESZCZYŃSKA, 2017). Mas a utilização como indicadores químicos de qualidade está ganhando importância. As BAs, principalmente as diaminas cadaverina (CAD) e histamina (HIS), vêm sendo mundialmente utilizadas para INDICAR a qualidade sanitária dos processos de produção, frescura de matérias-primas e, sobretudo, segurança alimentar (COÏSSON, 2004; COLLINS; NOERRUNG; BUDKA, 2011; ORDÓÑEZ et al., 2016). A ingestão excessiva de BAs através dos alimentos pode causar dores de cabeça, náuseas, crises de hipertensão, intoxicação histamínica, entre outros efeitos (TEN BRINK et al., 1990; LADERO et al., 2010). Putrescina, espermina, espermidina e cadaverina sob condições específicas, podem reagir com nitrito para formar compostos com propriedades carcinogênicas (BULUSHI et al., 2009).

Por outro lado, os conservantes são utilizados na industrialização de alimentos para evitar a multiplicação de micro-organismos indesejáveis, prolongando a vida de prateleira dos produtos. Entre as classes de conservantes utilizados para inibir micro-organismos em alimentos destacam-se: os ácidos orgânicos, macrolídeos políenios, bacteriocinas, ácido p-hidroxibenzóico (parabenos), entre outros. No entanto, a utilização desses compostos em alimentos deve ser estritamente regulada, dado ao potencial risco para a saúde e segurança dos consumidores (MOLOGNONI et al., 2016a). Apesar de muitos conservantes geralmente serem reconhecidos como seguros (GRAS, *generally recognized as safe*) e aprovados em muitos países para combater fungos, bolores e bactérias em alimentos, o uso abusivo pode trazer prejuízos à saúde dos consumidores. Casos de intolerância idiossincrática, urticárias, pseudo alergias, e convulsões foram reportados após o consumo abusivo de ácido sorbico e benzoico (DEUEL et al., 1954; HANNUKSELA; HAAHTELA, 1987; JUHLIN, 1981; WALKER, 1990; LENNERZ et al., 2015). Nisina (NIS) e natamicina (NAT) podem estar relacionado a alterações na resposta imune e a efeitos genotóxicos em roedores, após a administração de doses elevadas (MARTÍNEZ et al., 2013; PABLO et al., 1999). A utilização dos parabenos como conservantes, representa o sucesso de um agente antimicrobiano. Entretanto, estudos relatam uma possível associação do consumo de parabenos através de alimentos e cosméticos com o desenvolvimento de tumores em órgãos reprodutores humanos (DARBRE et al., 2004; DARBRE; HARVEY, 2008).

Diante da exigência dos órgãos reguladores em garantir a conformidade do uso de conservantes e monitorar a formação das amins biogênicas em matrizes alimentares, diversos métodos e técnicas analíticas foram empregadas. Mesmo que de maneira separada, a quantificação dessas substâncias foram relatadas utilizando cromatografia eletrocínica micelar (MEKC) (LI; XIE; FU, 2012; AN et al., 2015), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos (HPLC-DAD) (GUARINO et al., 2011; BACH et al., 2012), por fluorescência (HPLC-FLD) (HERRERO et al., 2016), espectrometria de ressonância magnética nuclear quantitativa (qHNMR), (OHTSUKI et al., 2012), biossensores (ALONSO-LOMILLO et al., 2010; NEDELJKO; TUREL; LOBNIK, 2017) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) (MILLÁN et al., 2007; SAGRATINI et al., 2012; SIROCCHI et al., 2014; MOLOGNONI et al., 2016a; MOLOGNONI et al., 2016b). No entanto, métodos

rápidos e multipropósito aplicados a uma vasta gama de matrizes e analitos são escassos. De fato, não se tem registro na literatura de um método capaz de determinar rapidamente diversas classes de conservantes e amins biogênicas simultaneamente em diferentes matrizes alimentares.

Diante da importância da conformidade técnica e sanitária dos alimentos fabricados em países signatários do Codex Alimentarius e dos alimentos serem objeto constante de violação e escândalos, este trabalho teve como objetivo: desenvolver um método rápido e multipropósito utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) para avaliar a integridade química de carnes, pescados e derivados. Para isso, diversas classes de BAs e conservantes foram analisadas simultaneamente com o objetivo de relacionar informações sobre o frescor dos alimentos a conformidade do uso de conservantes, tornando-se uma importante ferramenta para a fiscalização após comprovado desempenho analítico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padrões e reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, os solventes grau LC-MS e os padrões com no mínimo 98% pureza, exceto a nisina (NIS) com mínimo 2.5%. Natamicina (NAT) proveniente de *Streptomyces natalensis* e nisina (NIS) proveniente de *Lactococcus lactis* foram obtidos da Danisco (DuPont Nutrition and Health, EUA). Sorbato de potássio (SOR), ácido cítrico (CTA), ácido láctico (LCA), ácido benzoico (BEN), hidroximetilenotetramina (HMT), metilparabeno (MtP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP), butilparabeno (BuP), dicloridrato de histamina (HIS), dicloridrato 1-4-Diaminobutano (PUT), dicloridrato cadaverina (CAD), cloridrato de tiramina (TIR), trihidrocloreto de espermidina (SPD), tetrahidrocloreto espermina (SP) e os padrões internos dicloridrato 1,3-diaminopropano (1-3 DMP) e cloreto de 3,5-dinitro benzeno (3-5 DNB) foram todos fornecidos por Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Alemanha). Metanol e acetonitrila fornecidos por Merck KGaA (Alemanha). Ácidos fórmico e acético foram fornecidos por J.T. Baker Chemical Co. (EUA). Toda água foi ultrapura produzida pelo sistema de purificação (Milli-Q, França).

Soluções estoque de 10000 mg L⁻¹ de BEN, CTA, LCA, HMT, HIS, PUT, CAD, TIR, SP, SPD, 1-3 DMP e 1000 mg L⁻¹ de SOR, NAT, MtP, EtP, PrP, BuP e 3-5 DNB foram preparadas dissolvendo-os em metanol com baixa proporção de água. Já a solução estoque de 1000 mg L⁻¹ NIS foi preparada dissolvendo o padrão em 50:50 (água:acetronitrila) em 0,1% ácido fórmico, de acordo com Molognoni et al. (2016a). As soluções mix de fortificação foram preparadas a partir das soluções estoque de 1000 e 10000 mg L⁻¹ dissolvendo em metanol. Essas soluções foram divididas em aminas biogênicas (1000 mg L⁻¹), conservantes (50 mg L⁻¹ MtP, EtP, PrP, BuP, NAT; 100 mg L⁻¹ NIS, SOR; 1000 mg L⁻¹ BEN, LCA, HMT; 2000 mg L⁻¹ CTA e padrões internos (1000 mg L⁻¹ 1-3 DMP e 100 mg L⁻¹ 3-5 DNB). Todas as soluções foram estocadas a -20 ± 10 °C.

2.2 Amostras e brancos analíticos

Diferentes tipos comerciais de carnes, pescados e derivados foram utilizados no desenvolvimento do método. As amostras foram separadas por categorias. Carnes *in natura*: bovina, suína e frango (n= 20); carnes fermentadas e/ou curadas secas: salame, pepperoni, copa, presunto cru, *jerked beef*, *beef jarky* (n= 20); produtos cárneos cozidos e/ou apertizados: mortadela, bacon, salsicha, presunto, apresentado, fiambre, *corned beef*, *shredded beef*, *roast beef*, almôndega, peito de peru, *blanquet* (n= 30); peixes *in natura*: atum, bonito, anchova; peixe enlatado e/ou conserva; atum, sardinha e aliche (n= 25). Todas as amostras foram provenientes de fábricas brasileiras destinadas ao mercado interno e externo sob inspeção federal.

Foram utilizadas amostras brancas de carne *in natura* (musculo bovino), carne fermentada e curada (salame), carne cozida (*corned beef*) e pescado (atum). As amostras foram processadas e produzidas (salame) na Usina de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina e no próprio laboratório. Posteriormente foram analisadas quanto ao teor de umidade (105 °C até peso constante), liofilizadas (Liobrás Comércio e Serviço de Liofilizadores, Brasil) e estocadas a -20 °C até sua ressuspensão e uso.

2.3 Preparo das amostras

As amostras foram homogeneizadas e processadas utilizando um processador de alimentos. Entretanto, para as amostras contendo osso, um moinho de discos automáticos (Fortinox, Brasil) foi utilizado. Para o ensaio de natamicina, ácido sórbico em algumas amostras (carnes secas, curadas e fermentadas), as amostras foram divididas em duas porções, a primeira contendo apenas a superfície e/ou tripa e a segunda a porção interna da amostra homogeneizada. Para a análise dos demais analitos foi utilizado todo o conteúdo. As amostras após processadas foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em ultrafreezer (Panasonic Biomedical Co. EUA) até sua análise.

2.4 Método de extração

Foram pesados $2,0 \pm 0,1$ g de amostra diretamente em tubos de polipropileno para centrífuga com capacidade de 50 mL. Posteriormente foram adicionados a cada tubo 10 mL da solução de extração constituída de metanol:acetonitrila:água (45:45:10 v/v/v), acidificada com 0,1% de ácido acético. Homogeneizou-se a suspensão em desruptor de amostras Ultra Turrax T18 básico IKA (Alemanha), seguido de vigorosa agitação por 20 min em agitador orbital (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). Em seguida foram centrifugados (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) a 3600 g durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno com fundo cônico de capacidade de 15 mL e encaminhados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por meia hora utilizando ultrafreezer. Os tubos foram novamente centrifugados a 3600 g durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, uma alíquota de 50 μL de extrato foi diluída em 950 μL de fase móvel inicial (item 2.5) e injetado no sistema LC-MS/MS.

2.5 Análises por LC-MS/MS

Um espectrômetro de massas do tipo triplo quadruplo 5500 Sciex (EUA) acoplado ao cromatografo líquido 1290 Infinity Agilent Technologies, Inc. (EUA) foi utilizado. Fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e monitoramento múltiplo de reações (MRM)

em modo positivo e negativo foram empregados através dos softwares Analyst e MultiQuant (Sciex, EUA). Uma fase estacionária contendo di-isopropil-3-aminopropil silano ligado à sílica hidroxilada Zorbax 300 Stand Boat-CN, com tamanho de 150 mm x 4.6 mm e 5 μm de partícula foi empregada na separação.

As fases móveis consistiram de solução aquosa com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). A eluição foi através de gradiente linear como se segue: 0 - 1 min 90% A; 2 - 3 min 80% A; 4 min a 70% A; 5 - 6 min a 50% A; 7 - 8 min a 10% A; 9 min a 50% A; 10 min 90% A e mantido por 4 min para auto equilíbrio do sistema. A coluna foi mantida a 40 °C. Foi utilizado um fluxo de 500 $\mu\text{L min}^{-1}$ e o volume de injeção foi 10 μL .

A otimização do espectrômetro de massas em modo MRM foi obtida primeiramente através da infusão dos compostos separadamente em fluxo contínuo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, nas concentrações de 50 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. A otimização da fonte ESI em modo positivo e negativo foi realizada na concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando os analitos com menor sensibilidade no método. A otimização cromatográfica foi realizada considerando diversas fases estacionárias, fases móveis com e sem tampões, volumes de injeção, proporções de fase móvel inicial, temperatura de coluna e gradientes de eluição. Para isso, primeiramente foi injetado cada analito separadamente e depois todos juntos. Esses testes foram realizados primeiro em solvente e depois em matriz branca.

2.6 Validação analítica

A validação do método foi conduzida em termos de seletividade, faixas de trabalho e linearidade, precisão, recuperação, capacidade de decisão (CC_{α}), capacidade de detecção (CC_{β}), estabilidade e sensibilidade em termos de limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de acordo com Brasil (2011). Também foram avaliados o efeito de matriz de acordo com Hoff et al. (2015).

A seletividade foi verificada pela análise de no mínimo 20 amostras brancas e comerciais para cada categoria estudada. Esse procedimento visou avaliar os possíveis interferentes endógenos e exógenos provenientes das matrizes, contaminações entre corridas e perfil de fragmentação. Os resultados foram avaliados pela presença de picos interferentes em torno dos tempos de retenção dos analitos, após os mesmos serem

estabelecidos utilizando padrões puros e solvente. A avaliação foi realizada comparando as corridas das amostras brancas e comerciais, com e sem fortificação. Já para os analitos presentes naturalmente nas matrizes estudadas, a recuperação foi utilizada para evidenciar o aumento ou a diminuição do pico (sinal analítico) fixado no tempo. Para isso, as matrizes brancas obtiveram um maior fator de diluição antes da fortificação. Também foram utilizados valores crescentes de massa de amostra branca (gradiente de massa) para confirmar picos interferentes.

As curvas de calibração foram realizadas utilizando padronização interna (com exceção da NIS) com seis níveis de concentrações (incluindo o zero). Para isso, foi utilizada relação funcional linear (não ponderada) de razão das concentrações (eixo x) versus razão de áreas dos picos (eixo y). Todas as curvas foram realizadas em triplicata de ponto. As faixas de trabalho apresentaram equidistância e compreenderam de 25 a 200 mg kg⁻¹ para aminas biogênicas, BEN, LCA e HMT; 50 a 400 mg kg⁻¹ para CTA; 2,5 a 20 mg kg⁻¹ para NIS e SOR; 1,25 a 5,0 mg kg⁻¹ para os parabenos e NAT.

A linearidade do método foi avaliada através da reprodutibilidade de curvas de calibração preparadas em matriz. Para isso, foram preparadas com três repetições por nível, em dois dias distintos para todas as categorias estudadas. No total, foram realizadas dez curvas de calibração (duas por categoria de matriz e duas em solvente). O critério de aceitação foi através da média dos coeficientes de regressão (R^2) que deveria ser maior que 0,95 de acordo com os critérios de aceitabilidade interno do laboratório, considerando ensaios de amostras biológicas empregando LC-MS.

O efeito de matriz foi avaliado para verificar o aumento ou a supressão do sinal na presença das matrizes. O procedimento foi baseado na análise de dois tipos de curvas de calibração. A curva I consistiu em curva em solvente, preparada por diluição da solução padrão em fase móvel. Já a curva II, foi realizada em matriz branca fortificada com padrões antes do procedimento de extração. A avaliação foi realizada comparando-se as derivadas das retas obtidas em matriz e solvente, de acordo com Hoff et al. (2015).

A recuperação e a precisão (em termos de repetitividade e precisão intermediária) foram determinadas a partir de matriz branca fortificada de carne e pescados. Para isso, foram utilizados dois grupos de sete alíquotas fortificadas nos três primeiros níveis das curvas de calibração estabelecidas para cada analito. Quando havia limite regulatório estabelecido para o analito, o mesmo foi o ponto central da curva de calibração e o terceiro

ponto de fortificação. A recuperação e precisão em termos de precisão intermediária foram avaliadas empregando variáveis de medição como dias ($n = 2$) e analistas ($n = 3$). Os resultados foram obtidos através de curvas de calibração em matriz preparadas em triplicata de ponto, no mesmo dia do experimento para cada matriz. A avaliação da recuperação foi realizada pela taxa de recuperação, com limites aceitos de -20% a +10%. Já para precisão foram considerados satisfatórios os resultados com coeficiente de variação (CV) $< 20\%$.

A estabilidade do extrato foi avaliada em até dez dias de armazenamento em temperatura controlada de 4 ± 2 °C. Esse procedimento visou simular o tratamento a que os extratos são submetidos em rotina analítica até o término dos ensaios. Para essa avaliação, foram analisados 21 extratos sob condições de repetitividade de preparo e condições de precisão intermediária de leitura. Para cada período de 1, 2, 3, 7 e 10 dias, foi realizada a leitura em triplicata. Teste t (em par para médias), ao nível de 95% de probabilidade foi empregado para avaliar se houve diferença significativa entre a média das concentrações dos extratos lidos no momento do preparo (dia zero como referência) com os demais dias de avaliação. Primeiramente, foi avaliada a variabilidade da execução do procedimento, evitando confundir a queda da concentração por erros de precisão. Para isso, foram empregadas cartas-controle de desvio padrão e tendência central. A média dos desvios ($n = 21$) foi considerada como a linha central da carta de variabilidade. Já o limite superior e o limite inferior foram obtidos multiplicando-se o desvio padrão médio pelas constantes 2,57 e 0 respectivamente, em função do número de replicatas para se calcular cada desvio padrão da carta ($n = 3$).

Dá mesma forma que a avaliação do extrato, a estabilidade das soluções padrão (mix) de trabalho (aminas, conservantes e padrões internos) foi avaliada. Entretanto, essa avaliação considerou uma temperatura de armazenamento -20 ± 10 °C, temperatura adotada para armazenamento de padrões no laboratório e um período maior de avaliação de 1, 2, 3, 7, 10, 20 e 30 dias.

Capacidade de decisão (CC_{α}) foi obtido pela multiplicação do desvio-padrão da média das fortificações durante a validação, pelo fator 1,64 e ponderado na média geral. Já a capacidade de detecção (CC_{β}) foi obtido pela multiplicação do desvio-padrão pelo fator 1,64 e somando ao valor de CC_{α} . Esses parâmetros foram calculados considerando o primeiro nível de quantificação.

2.7 Incerteza de medição

Para identificar todas as contribuições de incerteza do procedimento analítico foi utilizado modelagem matemática a partir da soma ponderada das incertezas individuais de acordo com o *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (ISO, 2008). Para isso, foi utilizado um modelo de medição considerando padronização interna para todos os analitos, exceto para NIS que utilizou-se de padronização externa. As fontes de incerteza identificadas, avaliadas e posteriormente quantificadas foram: pesagem dos padrões e das amostras (atribuído erro máximo de 0,1 g), processos volumétricos e das funções lineares.

O modelo de medição utilizado com padronização interna e externa foi dado, respectivamente, pelas equações (1) e (2).

$$C \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{\left(\frac{A_{\text{analito}}}{A_{\text{PI}}} - b\right) \cdot C_{\text{PI}} \cdot V}{a \cdot m} \quad (1)$$

Onde: $C_{\text{mg kg}^{-1}}$: concentração do analito na solução estoque (mg kg^{-1}); m : massa da amostra (g); A_{analito} : área do analito (unidade de área (u.a)); A_{PI} : área do padrão interno (u.a); C_{PI} : concentração do padrão interno na solução de extração (mg kg^{-1}); V : volume da solução de extração (mL); a : coeficiente angular e b : coeficiente linear.

$$C_{\text{NIS}}(\text{mg kg}^{-1}) = \frac{L \cdot V}{m} \quad (2)$$

Onde: $C_{\text{mg kg}^{-1}}$: concentração de NIS na solução estoque (mg kg^{-1}); m : massa da amostra (g); V : volume da solução de extração (mL) e L : interpolação na reta de calibração (mg kg^{-1}).

A determinação da incerteza padrão combinada dos modelos de medição utilizando padrão interno e padrão externo foi calculada de acordo com as equações (3) e (4), respectivamente:

$$\begin{aligned}
& u^2(f(A_{\text{analito}}, A_{PI}, C_{PI}, a, b, m, V)) \\
&= \left(\frac{\partial f}{\partial A_{\text{analito}}}\right)^2 \cdot (\sigma A_{\text{analito}})^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial A_{PI}}\right)^2 \cdot (\sigma A_{PI})^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial C_{PI}}\right)^2 \cdot (\sigma C_{PI})^2 \\
&+ \left(\frac{\partial f}{\partial a}\right)^2 \cdot (\sigma a)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial b}\right)^2 \cdot (\sigma b)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial m}\right)^2 \cdot (\sigma m)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial V}\right)^2 \cdot (\sigma V)^2 \\
&+ 2 \cdot \left(\frac{\partial f}{\partial A_{\text{analito}}}\right) \cdot (\sigma A_{\text{analito}}) \cdot \left(\frac{\partial f}{\partial A_{PI}}\right) \cdot (\sigma A_{PI}) \cdot r_{A_{\text{analito}}, A_{PI}} \\
&+ 2 \cdot \left(\frac{\partial f}{\partial a}\right) \cdot (\sigma a) \cdot \left(\frac{\partial f}{\partial b}\right) \cdot (\sigma b) \cdot r_{a,b}
\end{aligned} \tag{3}$$

Onde u^2 : incerteza padrão combinada; $A_{\text{analito}}, A_{PI}, C_{PI}, a, b, m, V$: variáveis de medição do modelo global em unidades u.a, u.a, mg kg⁻¹, u.a mg⁻¹ kg, u.a, g, mL, respectivamente; $(\sigma x_i)^2$: incerteza padrão de saída e $\frac{\partial f^2}{\partial x_i}, \frac{\partial f}{\partial x_j}$: coeficientes de sensibilidade e $r_{i,j}$: coeficiente de correlação estimado.

$$u^2(f(L, V, m)) = \left(\frac{\partial f}{\partial L}\right)^2 \cdot (\sigma L)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial V}\right)^2 \cdot (\sigma V)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial m}\right)^2 \cdot (\sigma m)^2 \tag{4}$$

Onde u^2 : incerteza padrão combinada (mg kg⁻¹); L, V, m : variáveis de medição do modelo global em unidades mg L⁻¹, mL, g e adimensional, respectivamente; $(\sigma x_i)^2$: incerteza padrão de saída (mg kg⁻¹); $\frac{\partial f^2}{\partial x_i}$: coeficiente de sensibilidade.

Por fim, foi obtida a incerteza padrão expandida após a multiplicação da incerteza padrão combinada (equações 3 e 4) pelo coeficiente de abrangência k , baseados em uma distribuição do tipo t-Student (95%).

Por outro lado, abordagem experimental foi utilizada através dos efeitos randômicos (desvio padrão da média). Para isso, a exclusão de erros grosseiros (teste de Dixon) e sistemáticos empregando gráfico de dispersão por pontos foi realizado com 95% de abrangência de acerto.

Após o emprego das abordagens de cálculo de incerteza, todas as fontes de foram avaliadas criticamente. O valor global da incerteza foi determinado através de fontes significativas, considerando o nível do mensurando e a legibilidade da medida.

2.8 Expressão dos resultados

Os trabalhos de validação foram conduzidos para possibilitar duas formas de emissão de resultado com alta confiabilidade. Os analitos que não são permitidos nas matrizes tiveram a opção de serem expressos como positivo e negativo. Para isso, foram considerados resultados positivos para os analitos que apresentaram valores acima do valor de CC_{β} obtido para cada analito. Já para os analitos que são permitidos e possuem níveis regulatórios foram quantificados. Esses resultados obtiveram um mensurando (analito), incerteza de medição (95,45%) e unidade de medida (mg kg^{-1}).

2.9 Aplicabilidade do método

O método após ser validado foi simulado em rotina analítica. Para isso, diferentes amostras comerciais foram analisadas e fortificadas antes e após o procedimento de extração. Foi verificada a seletividade conforme item 2.6, o efeito da matriz e a recuperação de acordo com Hoff et al. (2015). O critério de aceitação da taxa de recuperação foi de -30 a +20%, de acordo com os procedimentos internos do laboratório, considerando ensaios por LC-MS e calibração em matriz.

Esse procedimento também visou avaliar se é possível utilizar um único tipo de amostra branca para calibração em matriz durante a rotina. Para isso, todas as amostras de produtos cárneos foram interpoladas em curvas realizadas com carne cozida (esterilizada comercialmente *corned beef*) e todo pescado analisado utilizou curvas com atum enlatado. Essas amostras foram escolhidas como branco por possuírem esterilidade comercial e serem geralmente isentas (10% do sinal da primeira concentração da curva) da maioria dos analitos, exceto para ácido láctico.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Método de extração

Um grande resultado alcançado neste estudo foi desenvolver um único método de extração para todos os analitos e diferentes matrizes alimentares. A extração sólido-

líquido com partição à baixa temperatura foi aplicada com êxito a uma vasta gama de compostos. Esse tipo de extração pode apresentar dificuldades quando os analitos possuem propriedades químicas distintas e as matrizes contêm grandes quantidades de macro componentes como proteínas, gorduras, açúcares e outros coadjuvantes de fabricação. Esse tipo de ambiente pode comprometer o desempenho da extração e conferir baixas recuperações (VALESE et al., 2017).

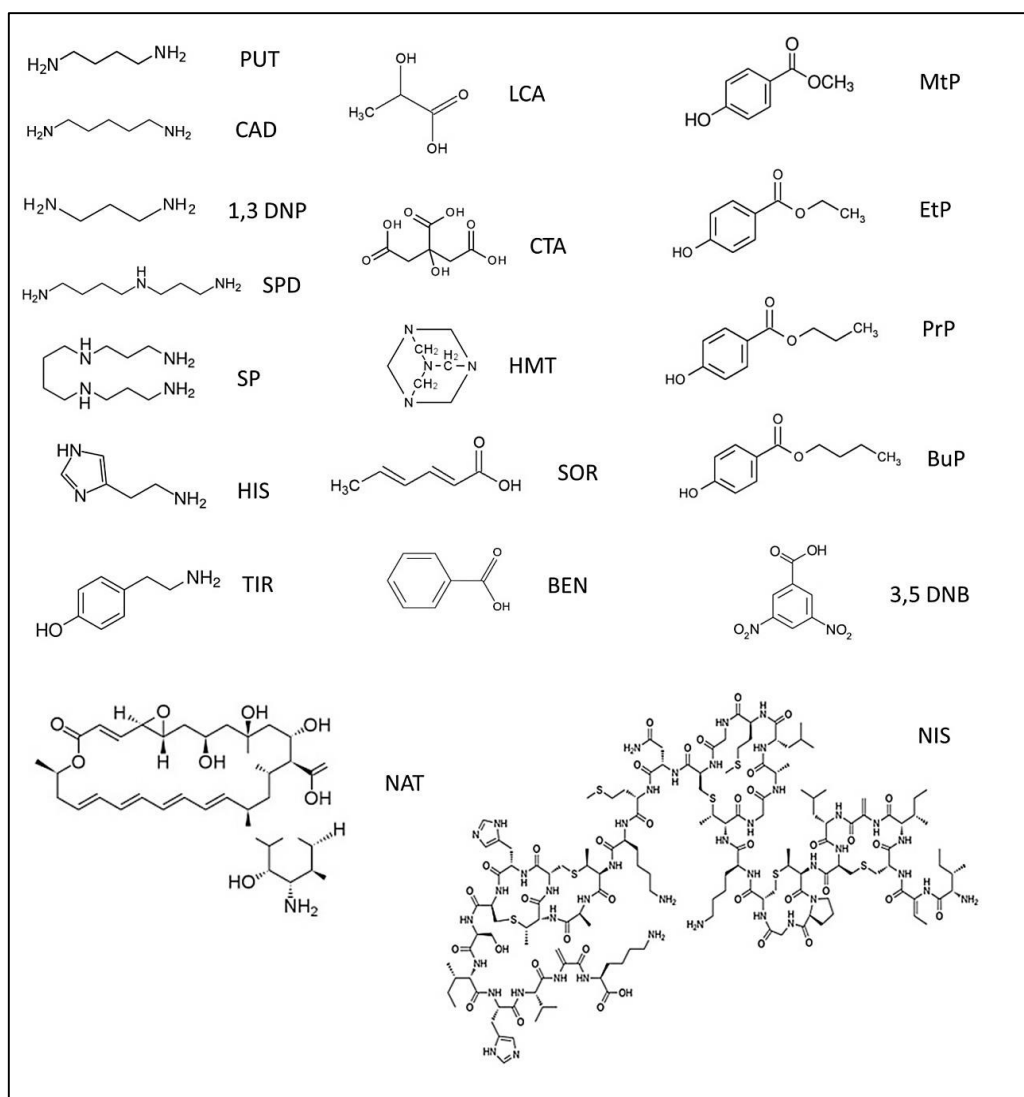
A melhor solução de extração do estudo foi quando a proporção de 45:45:10 ACN:MeOH:água e 0,1% ácido acético foi utilizados. A utilização de grandes proporções de ACN conferiu uma maior capacidade de precipitação dos concomitantes. Entretanto, NIS e CTA perderam sinal quando utilizados maiores proporções de ACN. Um estudo conduzido por Molognoni et al. (2016a), utilizou metanol para extrair de nisina em matrizes lácteas, contrariando a literatura que recomendava extrações aquosas para esse peptídeo. Este método também obteve recuperações aceitáveis utilizado até 90% de mistura orgânica na solução extratora. O uso de metanol em proporções certas com ACN e ácido acético favoreceu a extração de todos os analitos. Além disso, já de início promoveu a precipitação de algumas proteínas levando-as ao seu ponto isoelétrico e mudando da conformação no pH em 4,2 devido ao ácido acético. A partição à baixa temperatura foi eficaz no clean-up do extrato. A etapa de congelamento -80 °C seguida de centrifugação refrigerada, eliminou grandes quantidades de micelas de gordura e outros concomitantes de característica semelhante. O uso de solventes apolares não foi requerido, diminuindo o tempo de preparo e riscos à saúde dos analistas. Por fim, a melhor sensibilidade para todos os analitos foi alcançada na diluição do extrato em fase móvel inicial com 10% de orgânico.

3.2 Análises por LC-MS/MS

Diferentes métodos utilizando LC-MS para determinação simultânea de BAs e aminoácidos têm sido relatados (REDRUELLO et al., 2017; JIA et al., 2011). Entretanto, determinar simultaneamente BAs junto a conservantes com diferentes funções orgânicas foi algo engenhoso. Isso foi possível utilizando cromatografia líquida em fase reversa com di-isopropil-3-cianopropil silano ligado à sílica hidroxilada como fase estacionária. Nesse caso, o método foi capaz de determinar peptídeos de 3,5 kDa, anéis de lactona com

açúcares de 665 g mol^{-1} , ácidos orgânicos e aminas de baixa massa molecular (70 a 200 g mol^{-1}) em uma única corrida cromatográfica de dez minutos (Figura 2).

Figura 1 – Estruturas químicas: ácido sórbico (SOR), ácido benzóico (BEN), hexametilenotetramina (HMT), natamicina (NAT), nisina (NIS), ácido cítrico (CTA), ácido láctico (LCA), metilparabeno (MtP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP), butilparabeno (BuP), cadaverina (CAD), histamina (HIS), putrescina (PUT), espermidina (SPD), espermina (SP), tiramina (TIR), 1,3-diaminopropano (1,3-DMP), e 3,5-ácido dinitrobenzóico (3,5-DNB).



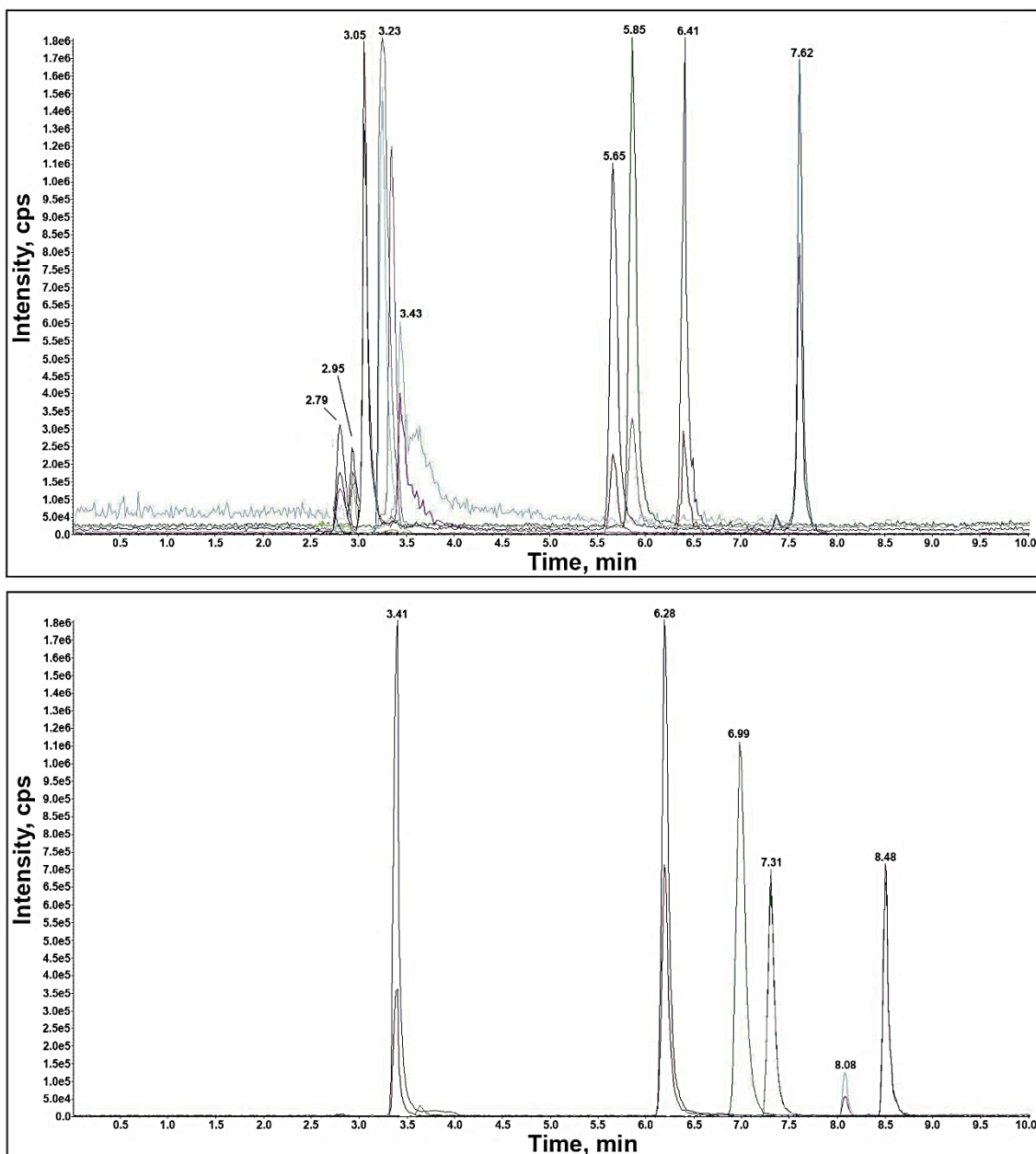
Fonte: Molognoni et al. (2019).

A fase estacionária protegida estericamente foi desenvolvida em meados de 1987 por Kirkland, Glajch e Farlee (1989). Atualmente conhecidas como *Zorbax StableBond®*, são amplamente utilizadas com diferentes grupos químicos ligado à sílica (KIRKLAND; GLAJCH; FARLEE, 1989). Neste estudo, o grupamento hidrofóbico e volumoso cianopropil foi utilizado com êxito no método cromatográfico e permitiu a utilização de

fases móveis de baixo pH, propiciando uma melhora na ionização das moléculas em ESI. Como podemos observar no cromatograma apresentado pela figura 3, o grupamento cianopropil em fase reversa foi seletiva para insaturações. TIR obteve a maior retenção entre as aminas (3,25 min), já que é a única molécula a possuir um anel aromático. Da mesma forma, BEN apresentou o maior tempo de retenção entre os ácidos orgânicos (5,85 min), isso porque também é o único ácido orgânico do grupo com um anel aromático em sua estrutura química. Por outro lado, moléculas semelhantes ao tipo de função orgânica e número de insaturações tiveram maior retenção na fase quando possuía uma maior cadeia carbônica. Isso pode ser evidenciado com os parabenos, onde MtP obteve menor retenção em relação ao BtP e as aminas CAD e PUT que diferem somente no tamanho da cadeia carbônica.

O uso do ácido fórmico 0,1% como aditivo de fase móvel apresentou uma melhora em todos os analitos, mesmo em modo negativo, descartando o uso de sais de amônio. A válvula de desvio do MS foi utilizada até os dois primeiros minutos de cada corrida. Esse procedimento visou desviar do MS parte dos compostos extraídos pelo MeOH que não são retidos na fase estacionária (cetoses, aldoses, eletrólitos) diminuindo as sujidades da fonte ESI e diminuindo o tempo de auto equilíbrio do sistema.

Figura 2 – Cromatograma obtido por LC-MS/MS em amostra branca fortificada. Em modo positivo no cromatograma acima: 2,79 min 1,3-diaminopropano, putrescina, cadaverina e histamina; 2,95 min espermidina e espermina; 3,05 min hexametilenotetramina; 3,23 min, tiramina; 3,43 min ácido cítrico; 5,65 min ácido sórbico; 5,85 min ácido benzóico; 6,41 min nisina e 7,62 min natamicina. Em modo negativo no cromatograma abaixo: 3,41 min ácido láctico; 6,28 min metilparabeno; 6,99 min ácido 3,5-dinitrobenzóico; 7,31 min etilparabeno; 8,08 min propilparabeno e 8,48 min butilparabeno.



Fonte: Molognoni et al. (2019).

A otimização dos analitos em MS/MS foi realizada para se obter a máxima sensibilidade possível para satisfazer os critérios de identificação de substâncias por LC-MS/MS. Dessa forma, um íon precursor e dois íons de segunda geração foram requeridos.

Os fragmentos mais intensos foram utilizados na quantificação dos analitos e os segundos fragmentos na identificação dos compostos. Todos os parâmetros otimizados nos quadrupolos são apresentados na tabela 1. As intensidades relativas das transições ficaram todas acima de 20%, demonstrando sensibilidade e reprodutibilidade. Por outro lado, os analitos PUT e SPD não apresentaram mais de um fragmento sensível e reprodutível. Nesse caso, foi utilizado somente um produto de quebra para cada molécula. Apesar de contrariar as recomendações para quantificação por LC-MS/MS, pode-se encontrar na literatura diversos métodos que utilizam somente um fragmento para identificar PUT e SPD (MILLÁN et al., 2007; SAGRATINI et al., 2012; SIROCCHI et al., 2014).

A otimização da fonte ESI aumentou a sensibilidade de alguns analitos que anteriormente não apresentavam boa reprodutibilidade. Ao utilizar o analito de pior desempenho na atomização, conferiu uma melhora para todos. Além disso, não foi evidenciada a fragmentação dos analitos na fonte de ionização, mesmo utilizando padrões isotópicos com massa molar próxima, perda de água e com considerável facilidade de quebra. Ao final da otimização da fonte em modo positivo e negativo, os parâmetros corresponderam a (\pm) 5000 V (voltagem no capilar), 650 °C (temperatura da fonte), 55 libra força por polegada ao quadrado (psi) para gases auxiliares e de secagem e 20 psi para gás de cortina.

Tabela 1 – Parâmetros de otimização nos quadrupolos através do monitoramento múltiplo de reações de analito.

Analitos	Padrão interno	Fórmula molecular	Tempo de retenção (min)	Íon precursor (carga)	Transição de quantificação (Q) (EC, em V)	Transição de confirmação (C) (EC, em V)	DP (V) Q/C	CXP(V) Q/C
Conservantes (ácidos orgânicos)								
Ácido sórbico (SOR) e seus sais	3,5-DNB	C ₆ H ₈ O ₂	5,6	112,9 (+)	67,0 (19)	65,0 (25)	56/56	8/8
Ácido benzóico (BEN) e seus sais	3,5-DNB	C ₇ H ₆ O ₂	5,8	122,9 (+)	79,0 (17)	51,0 (51)	36/36	12/24
Ácido cítrico (CTA) e seus sais	3,5-DNB	C ₆ H ₈ O ₇	3,4	193,1 (+)	129,0 (17)	175,0 (9)	31/31	6/10
Ácido láctico (LCA) e seus sais	3,5-DNB	C ₃ H ₆ O ₃	3,4	89,0 (-)	43,3 (-13)	45,1 (-12)	-34/-27	-12/-4
Conservantes (orgânicos heterocíclicos)								
Hexametilenotetramina (HMT)	3,5-DNB	C ₆ H ₁₂ N ₄	3,0	141,1 (+)	112,0 (11)	98,0 (21)	51/51	8/4
Conservantes (Bacteriocinas – lantibióticos)								
Nisina (NIS)	-	C ₁₄₃ H ₂₃₀ N ₄₂ O ₃₇ S ₇	6,4	672,1 (5+)	811,3 (23)	649,3 (23)	56/56	38/30
Conservantes (macrolídeo polieno)								
Natamicina (NAT)	3,5-DNB	C ₃₃ H ₄₇ NO ₁₃	7,6	666,2 (+)	503,2 (17)	485,2 (21)	56/56	22/24
Conservantes (parabenos)								
Metilparabeno (MtP)	3,5-DNB	C ₈ H ₈ O ₃	6,2	151,0 (-)	91,9 (-24)	135,9(-18)	-50/-50	-15/-9
Etilparabeno (EtP)	3,5-DNB	C ₉ H ₁₀ O ₃	7,3	165,0 (-)	137,0 (-18)	93,0 (-26)	-10/-10	-7/-7
Propilparabeno (PrP)	3,5-DNB	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	8,0	179,0 (-)	92,9 (-16)	108,0 (-30)	-40/-120	-9/-5
Butilparabeno (BuP)	3,5-DNB	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	8,4	193,0 (-)	136,9 (-20)	92,9 (-26)	-105/-105	-9/-15
Aminas biogênicas aromáticas								
Histamina (HIS)	1,3-DMP	C ₅ H ₉ N ₃	2,8	112,1 (+)	54,1 (50)	68,1 (9)	64/63	25/29
Tiramina (TIR)	1,3-DMP	C ₈ H ₁₁ NO	3,2	138,1 (+)	121,0 (15)	77,0 (40)	46/46	10/12
Diaminas biogênicas alifáticas								
Putrescina (PUT)	1,3-DMP	C ₄ H ₁₂ N ₂	2,7	89,1 (+)	72,0 (10)	-	41	12
Cadaverina (CAD)	1,3-DMP	C ₅ H ₁₄ N ₂	2,8	102,8 (+)	86,0 (13)	42 (21)	36/36	10/10
Poliaminas biogênicas poli alifáticas								
Espermidina (SPD)	1,3-DMP	C ₇ H ₁₉ N ₃	2,9	146,9 (+)	84,0 (25)	130,0 (7)	61/56	10/10
Espermina (SP)	1,3-DMP	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	2,9	203,3 (+)	112,0 (40)	42,0 (40)	50/50	15/15
Padrões internos								
1,3-diaminopropano (1,3-DMP)	-	C ₃ H ₁₀ N ₂	2,7	75,1 (+)	58,0 (13)	-	76/76	10/10
Ácido 3,5-dinitrobenzóico (3,5-DNB)	-	C ₇ H ₄ O ₆ N ₂	6,9	210,9 (-)	166,9 (-14)	-	-45/-45	-15/-15

CE = energia de colisão; CXP = potencial de saída; DP = potencial na fonte; EP = potencial de entrada; Q/C = quantificação/confirmação.

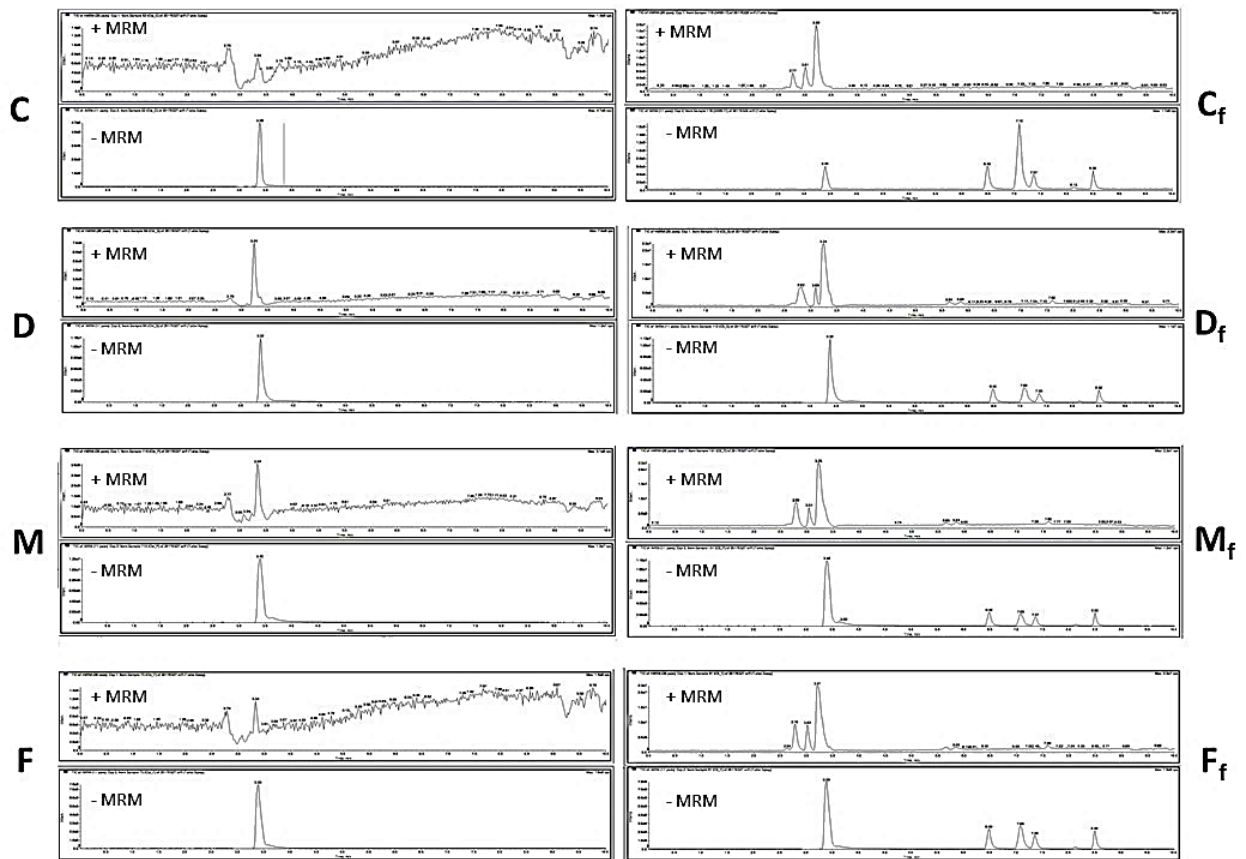
Fonte: Molognoni et al. (2019).

3.3 Validação do método

Independentemente da técnica analítica empregada, a confiabilidade do dados deve ser verificados por meio de procedimentos de validação (ABNT, 2017). Neste estudo, conseguiu-se com êxito desenvolver um método rápido, com extração simples e que fornece diferentes respostas à fiscalização de carnes, pescados e derivados. Pela primeira vez na literatura foi reportado um método capaz de determinar simultaneamente conservantes e BAs em diferentes matrizes alimentares. Os resultados dos parâmetros de validação demonstraram que o método desenvolvido possui confiabilidade metrológica para execução em rotina laboratorial, substituindo pelo menos quatro processos de implementação de outros métodos para atender ao propósito.

Analitos de baixa massa molecular são passíveis de transições interferentes em análises por LC-MS, provenientes de substâncias complexas como os alimentos. Apesar disso, a seletividade do método foi comprovada para todos os analitos. Não foram observadas transições interferentes em torno do tempo de retenção dos analitos e nem dos padrões internos. Por outro lado, todas as amostras brancas das diferentes classes apresentam um pico no tempo de retenção de 3,40 min, parte C, D, M e F de cada cromatograma na parte MRM⁻ da figura 4. Isso se deve à presença natural do analito LCA, em todas as matrizes estudadas. Já em amostras brancas de carne *in natura*, fermentada (salame) e pescado, as aminas PUT, ESPD e TIR também apresentaram picos na parte D e M de cada cromatograma em MRM⁺ da figura 4. Entretanto, o processo de fortificação dos analitos nessas amostras conferiu o aumento do sinal do pico mantido no mesmo tempo de retenção. Já os picos interferentes que pudessem ser confundidos com os analitos, permaneceram com o sinal constante durante essa avaliação. Por fim, as corridas utilizando somente fase móvel demonstraram que todas as transições não são passíveis de contaminações. Além disso, o tempo de auto equilíbrio do sistema de 4 min foi suficiente para garantir a limpeza do sistema entre cada corrida (figura 4).

Figura 3– Cromatogramas obtidos durante avaliação da seletividade. Na esquerda, cromatogramas de amostras brancas; no lado direito, cromatogramas de amostras brancas fortificadas com os analitos. C = produto cárneo cozido; D = produto cárneo fermentado; M = carnes *in natura*; F = pescado. A letra f representa o processo de fortificação das amostras.



Fonte: Molognoni et al. (2019).

O método apresentou linearidade nas faixas de concentrações estudadas para todas as matrizes avaliadas (Tabela 2). Os valores médios dos coeficientes de regressão foram satisfatórios e superiores a 0,98. Por outro lado, o resultado do efeito de matriz demonstrou ganho ou perda do sinal dos analitos na presença das matrizes. Como pode ser observado na figura 3, pode-se traçar um perfil do efeito de matriz de acordo com cada classe de analito avaliado. Todos os parabens MtP, EtP, PrP e BuT apresentaram um perfil semelhante de ganho de sinal, com valores maiores para o BuT. Já as BAs TIR, CAD e SPD apresentaram uma supressão de sinal e PUT e SP um ganho de sinal acima de 60%. NIS apresentou o maior efeito de matriz do método. Por outro lado, também podemos traçar um perfil do efeito de matriz de acordo com cada tipo de matriz avaliada. Nesse caso, pode-se fazer uma relação com o tipo de processamento que as amostras foram submetidas (por exemplo, tratamento térmico, processo

de cura, processo fermentativo, apertizados) com o efeito de matriz. Além da estrutura química dos compostos a composição da matriz proporciona diferentes perfis em fontes ESI. A forma da extração e *clean-up* podem estar diretamente relacionados ao efeito de matriz obtido. Estudos utilizando métodos de extração com maior funcionalidade de *clean-up*, também reportaram elevados efeitos de matriz na quantificação de BAs em pescados por LC-MS (SAGRATINI et al., 2012). Nesse sentido, foi adotada calibração em matriz para a rotina analítica. A HIS não apresentou efeito de matriz no estudo com valores abaixo de 20%. ACL também não apresentou efeito de matriz, uma vez que as amostras são diluídas no mínimo 100000 vezes antes da injeção em fase móvel inicial, eliminando os efeitos na fonte.

Tabela 2 – Resultados dos parâmetros de linearidade e limites analíticos.

Analitos	Curvas analíticas em matriz		R ²	CC _α mg kg ⁻¹	CC _β mg kg ⁻¹	LoD mg kg ⁻¹	LoQ mg kg ⁻¹
	Matriz	Equações da reta					
Metilparabeno	Carne (músculo)	$y = 0,471 x + 0,001$	0,99	1,94	2,43	1,00	1,25
	Cárneo (fermentado/seco)	$y = 0,485 x + 0,001$	0,99				
	Cárneo (cozido)	$y = 0,489 x - 0,008$	0,99				
	Pescados	$y = 0,564 x - 0,009$	0,99				
Etilparabeno	Carne (músculo)	$y = 0,229 x + 0,001$	0,99	2,27	2,99	1,00	1,25
	Cárneo (fermentado/seco)	$y = 0,230 x + 0,002$	0,99				
	Cárneo (cozido)	$y = 0,242 x - 0,004$	0,99				
	Pescados	$y = 0,276 x - 0,005$	0,99				
Propilparabeno	Carne (músculo)	$y = 0,035 x + 0,002$	0,99	2,23	2,92	1,00	1,25
	Cárneo (fermentado/seco)	$y = 0,035 x + 0,002$	0,99				
	Cárneo (cozido)	$y = 0,038 x - 0,002$	0,99				
	Pescados	$y = 0,041 x - 0,009$	0,99				
Butilparabeno	Carne (músculo)	$y = 0,247 x + 0,001$	0,99	1,56	1,79	1,00	1,25
	Cárneo (fermentado/seco)	$y = 0,235 x + 0,001$	0,99				
	Cárneo (cozido)	$y = 0,258 x - 0,002$	0,99				
	Pescados	$y = 0,281 x - 0,008$	0,99				
Natamicina	Carne (músculo)	$y = 0,142 x + 0,003$	0,98	1,69	1,99	1,00	1,25
	Cárneo (fermentado/seco)	$y = 0,156 x - 0,008$	0,99				
	Cárneo (cozido)	$y = 0,188 x - 0,004$	0,98				
	Pescados	$y = 0,161 x - 0,003$	0,99				
Nisina	Carne (músculo)	$y = 34228 x + 34406$	0,98	2,94	3,25	1,75	2,5
	Cárneo (fermentado/seco)	$y = 16252 x + 30434$	0,98				
	Cárneo (cozido)	$y = 29160 x + 23160$	0,95				
	Pescados	$y = 44741 x + 26551$	0,98				
Ácido sórbico	Carne (músculo)	$y = 0,108 x + 0,004$	0,98	3,08	4,07	1,00	2,5
	Cárneo (fermentado/seco)	$y = 0,117 x + 0,002$	0,99				
	Cárneo (cozido)	$y = 0,116 x - 0,002$	0,99				
	Pescados	$y = 0,140 x - 0,009$	0,98				
Ácido benzoico	Carne (músculo)	$y = 0,011 x + 0,004$	0,99	30,1	33,7	15,0	25,0
	Cárneo (fermentado/seco)	$y = 0,012 x + 0,004$	0,99				
	Cárneo (cozido)	$y = 0,012 x + 0,009$	0,99				
	Pescados	$y = 0,015 x - 0,005$	0,99				

continua

Tabela 2 – Resultados dos parâmetros de linearidade e limites analíticos.

Analitos	Curvas analíticas em matriz			conclusão			
	Matriz	Equações da reta	R ²	CC _α mg kg ⁻¹	CC _β mg kg ⁻¹	LoD mg kg ⁻¹	LoQ mg kg ⁻¹
Ácido cítrico	Carne (músculo)	y = 0,003 x + 0,010	0,98	53,3	56,6	35,0	50,0
	Cárneo	y = 0,001 x - 0,003	0,98				
	(fermentado/seco)	y = 0,002 x + 0,002	0,97				
	Pescados	y = 0,001 x + 0,023	0,98				
Ácido cítrico	Carne (músculo)	y = 0,003 x + 0,010	0,98	53,3	56,6	35,0	50,0
	Cárneo	y = 0,001 x - 0,003	0,98				
	(fermentado/seco)	y = 0,002 x + 0,002	0,97				
	Pescados	y = 0,001 x + 0,023	0,98				
Hexametilenotetramina	Carne (músculo)	y = 0,0533 x + 0,020	0,99	36,2	43,2	15,0	25,0
	Cárneo	y = 0,0283 x + 0,001	0,99				
	(fermentado/seco)	y = 0,0540 x - 0,004	0,99				
	Pescados	y = 0,4425 x - 0,023	0,99				
Cadaverina	Carne (músculo)	y = 0,794 x + 0,002	0,99	31,9	48,5	15,0	50,0
	Cárneo	y = 0,942 x + 0,013	0,99				
	(fermentado/seco)	y = 0,796 x - 0,002	0,99				
	Pescados	y = 1,075 x + 0,001	0,98				
Histamina	Carne (músculo)	y = 0,379 x + 0,039	0,99	32,6	48,7	10,0	25,0
	Cárneo	y = 0,396 x + 0,038	0,99				
	(fermentado/seco)	y = 0,366 x + 0,030	0,99				
	Pescados	y = 0,4360 x + 0,026	0,99				
Espermidina	Carne (músculo)	y = 0,2217 x + 0,0946	0,98	28,5	30,8	20,0	25,0
	Cárneo	y = 0,2721 x + 0,1251	0,98				
	(fermentado/seco)	y = 0,2223 x + 0,0708	0,97				
	Pescados	y = 0,2400 x + 0,1435	0,96				
Espermina	Carne (músculo)	y = 0,0172 x - 0,0025	0,99	28,5	30,9	20,0	50,0
	Cárneo	y = 0,0023 x + 0,0050	0,95				
	(fermentado/seco)	y = 0,0138 x - 0,0021	0,95				
	Pescados	y = 0,1233 x - 0,0072	0,95				
Tiramina	Carne (músculo)	y = 2,6558 x + 0,2585	0,99	28,3	30,6	20,0	25,0
	Cárneo	y = 2,5957 x + 1,7762	0,97				
	(fermentado/seco)	y = 3,9632 x + 0,4670	0,99				
	Pescados	y = 4,8944 x + 0,4029	0,98				
Putrescina	Carne (músculo)	y = 1,8335 x - 0,2410	0,99	28,2	34,9	15,0	25,0
	Cárneo	y = 0,9477 x - 0,1602	0,98				
	(fermentado/seco)	y = 0,9910 x - 0,1452	0,99				
	Pescados	y = 1,4335 x - 0,1400	0,99				

CC_α = limite de decisão; CC_β = capacidade de decisão; LoD = limite de detecção; LoQ = limite de quantificação.

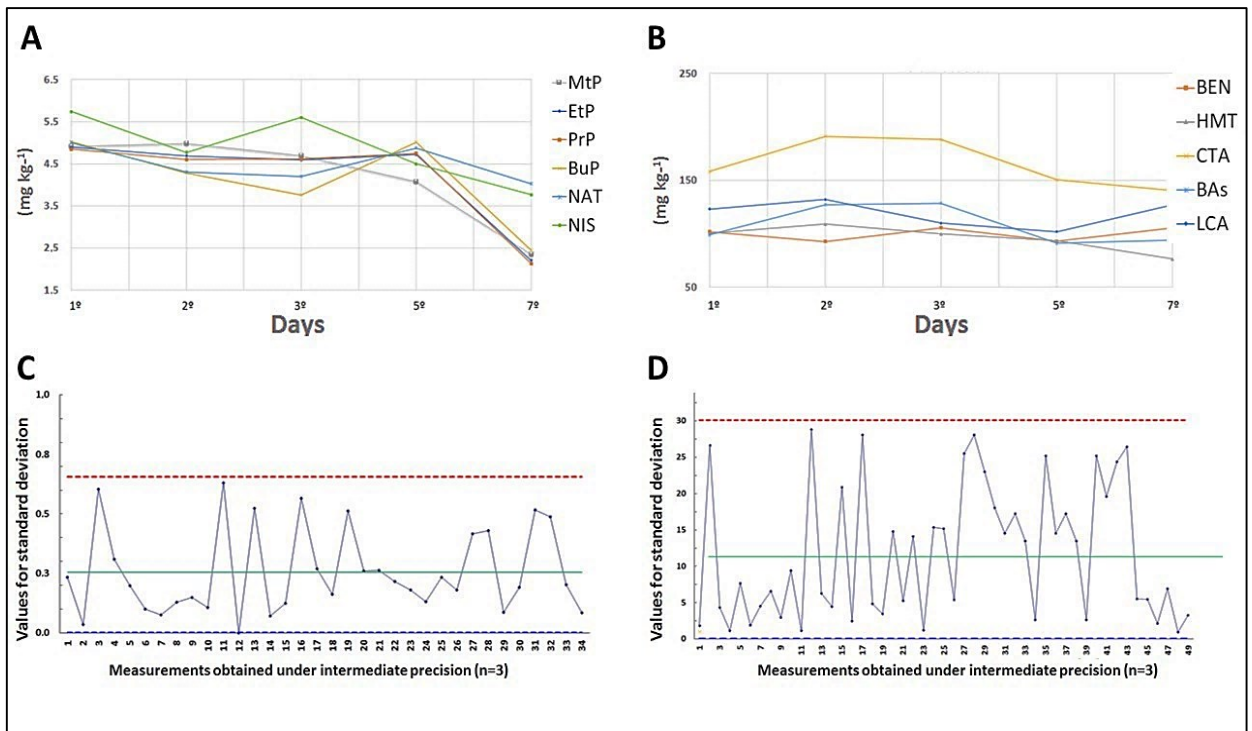
Fonte: Molognoni et al. (2019).

A complexidade de analisar simultaneamente diversas classes de compostos em matrizes complexas utilizando LC-MS fica claramente demonstrada quando o método é submetido a testes de precisão e exatidão (VALESE et al., 2017). A precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária apresentaram coeficiente de variação inferiores a 20% para a maioria dos analitos. Já as taxas de recuperação ficaram em torno de 78 a 120%. Os

melhores valores podem ser considerados para a classe dos parabenos, que apresentaram boas recuperações e baixos desvios de precisão. Por outro lado, CTA, HMT, SPD, SP e NIS apresentaram maiores desvio de precisão e baixas taxas de recuperação. Apesar de algumas recuperações ficarem em desacordo com o protocolo de validação adotado (80 a 110%), os resultados foram considerados aceitáveis, considerando que as amostras foram interpoladas em curvas realizadas em matriz. Além disso, as taxas de recuperação foram obtidas através de três níveis de fortificação avaliados em três dias distintos utilizando estatística robusta com baixo número de observações.

A avaliação da estabilidade do extrato demonstrou que até o 5º dia todos os analitos são estáveis no extrato armazenado a 4 ± 2 °C (Figura 5). Entretanto, quando a avaliação chegou ao 7º dia, todos os analitos permaneceram estáveis, exceto a classe dos parabenos. Foi observada a perda significativa da concentração de todos os parabenos (MtP, EtP, PrP, BuP) no extrato ($P < 0,05$). O parâmetro demonstrou alta confiabilidade nos resultados com baixas incertezas de 2,1% e 3,3% para analitos avaliados em 5 e 100 mg kg⁻¹, respectivamente. Esses valores demonstram a boa precisão intermediária dos analitos durante as leituras instrumentais. Por outro lado, as soluções padrão de trabalho (*mixes*) de BAs, padrões internos e conservantes demonstraram estabilidade até o período máximo de avaliação (30 dias), nas condições experimentais adotadas. A variabilidade do parâmetro foi considerada adequada, com uma incerteza expandida referente à precisão de 5,2%.

Figura 4– Gráficos (concentração em mg kg^{-1} versus dias) para o teste de estabilidade dos extratos (A, B) e gráficos de controle (C, D) da variabilidade do parâmetro. Analitos: ácido sórbico (SOR), ácido benzóico (BEN), hexametenotetramina (HMT), natamicina (NAT), nisina (NIS), ácido cítrico (CTA), ácido láctico (LCA), metilparabeno (MtP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP), butilparabeno (BuP) e aminas biogênicas (BAs).



Fonte: Molognoni et al. (2019).

A sensibilidade do método foi comprovada com a obtenção de limites de detecção e quantificação satisfatórios ao propósito do método (Tabela 2). Os menores limites foram alcançados para os conservantes que não são permitidos em diversos produtos. O valor do limite mínimo exigido levou em consideração o propósito da adição de conservantes na fabricação, onde quantidades muito pequenas não conferem sentido tecnológico. Além disso, o método foi modelado para trabalhar em faixas de medições reais em rotina analítica. Como pode ser visto na tabela 2, os menores limites foram alcançados para os analitos MtP, EtP, PrP, BuP, NAT, NIS e SOR. Já no para as BAs, CAD, HIS e PUT apresentaram os menores limites.

Por outro lado, as violações podem ocorrer pelo desrespeito a um nível regulatório estabelecido (exemplo: máximo de 100 mg kg^{-1} de histamina em atum) ou pela detecção de substâncias não autorizadas (exemplo: adição de sorbato em salsicha). Estudos recentes relatam as duas formas de violação mencionadas. Devido às tendências do uso de conservantes em práticas de fabricação, SOR, NAT, NIS e BEN podem estar sendo utilizados irregularmente em

diversos produtos de origem animal (MOLOGNONI et al., 2016a; MOLOGNONI et al., 2016b; SANTOS et al., 2016). Neste estudo, o erro β foi utilizado com êxito na confiabilidade de resultados positivos. O procedimento de se utilizar esse valor para emitir um resultado positivo, diminui o gasto de insumos e fontes de erros ao evitar procedimentos de diluição para manter os sinais dos analitos no domínio da função de calibração. Foram considerados positivos os conservantes MtP, EtP, PrP, BuP, NAT, SOR, BEN, HMT e NIS que obtiveram resultados acima de seus respectivos valores CC_{β} (Tabela 2). Por outro lado, os valores de CC_{α} foram utilizados em tomadas de decisões considerando limites regulatórios. Por exemplo, pode-se considerar amostras de atum não conformes em relação à quantidade de HIS quando os valores foram acima de $132,6 \text{ mg kg}^{-1}$. Já os resultados de NAT em salame só poderiam ser considerados não conformes quando acima de $6,69 \text{ mg kg}^{-1}$, considerando que o valor máximo permitido de NAT em carnes fermentadas é de 5 mg kg^{-1} . Já em amostras de carnes secas e curadas, SOR pode ser utilizado na superfície do produto em 200 mg kg^{-1} (BRASIL, 2019). Nesse caso seria considerado um resultado não conforme com valores acima de $246,0 \text{ mg kg}^{-1}$ na superfície e positivo de SOR no interior com valores acima de $3,08 \text{ mg kg}^{-1}$.

3.4 Incerteza de medição global da ferramenta de medição

Os mensurandos geralmente encontrados em medições químicas, diferem de muitos outros processos metrológicos por já estarem adequadamente bem definidos. Esse processo torna as incertezas referente às calibrações de balanças, vidrarias e outros instrumentos geralmente insignificantes ao comparar com efeitos randômicos gerados por equipamentos como LC-MS e analistas, considerando um limitado número de observações (ISO, 2008). Além disso, abordagens experimentais parecem ser mais apropriadas para estimar a incerteza de métodos aplicados a um grande número de analitos (VALESE et al., 2017). Por outro lado, a estimativa de uma incerteza expandida pode não ser representativa do processo de medição ao não considerar todas as fontes significativas de incerteza (MOLOGNONI et al., 2017). Na tabela 3, são apresentadas as fontes de incerteza do método desenvolvido. Como podemos observar as incertezas herdadas (tipo b) são desprezíveis em relação as incertezas experimentais (tipo a), obtidas em processos de validação. A modelagem matemática demonstrou que nenhuma correlação de variáveis e ou fontes de incertezas foram negligenciadas.

Tabela 3 – Valores das principais fontes de incertezas padrão obtidas em procedimentos analíticos após a aplicação da modelagem matemática para as estimativas.

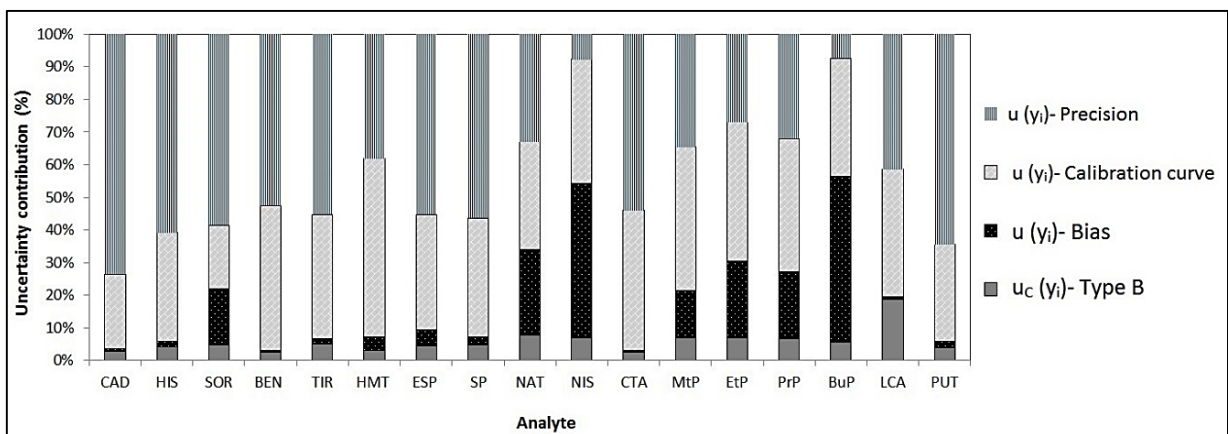
Tipo	Fonte	Valor do mensurando	Valor da incerteza	Divisor	u(xi)	Unidade de entrada	Distribuição	Ci	u(yi)	Unidade de saída	V _{eff}
B	Pesagem u(m)	2100,0	0,0100	2,02	0,0050	mg	t-Student	-1,12	0,0100	mg kg ⁻¹	∞
B	Volume u(V)	10,00	0,0013	2,02	0,001	ml	t-Student	0,24	0,0002	mg kg ⁻¹	∞
A	Curva analítica u(L)	10,00	0,502	2,23	0,230	mg kg ⁻¹	t-Student	4,76	1,073	mg kg ⁻¹	17
							Incerteza padrão combinada (u _c) =	1,07			V _{eff} = 17,00
							Incerteza padrão expandida (U) =	2,35			
							Fator de abrangência (k) =	2,20			U(y) = 23%
B	Pesagem u(m)	2100,0	0,0124	2,02	0,006	mg	t-Student	7,9E-05	4 E-07	mg kg ⁻¹	∞
B	Volume u(V)	10,00	0,401	2,02	0,198	ml	t-Student	-1,7E-02	0,0033	mg kg ⁻¹	∞
A	Area do analito u(A)	1,00E+05	9,7780	2,00	4,889	a.u	t-Student	4,8E-07	2 E-06	mg kg ⁻¹	17,00
B	Concentração do Padrão interno u(IS)	100,00	0,0023	2,00	0,001	mg kg ⁻¹	t-Student	-1,7E-03	2 E-06	mg kg ⁻¹	∞
A	Área do PI u(A _{IS})	4,50E+06	440,01	2,00	220,01	a.u	t-Student	-1,1E-08	2 E-06	mg kg ⁻¹	17,00
A	Coef. linear u(a)	0,100	0,302	1,73	0,174	a.u	Retangular	-2,2E+00	0,374	mg kg ⁻¹	17,00
A	Coef. angular u(b)	0,222	3,406	1,73	1,967	a.u mg ⁻¹ kg	Retangular	7,5E-01	1,478	mg kg ⁻¹	17,00
							Coeficiente de correlação (r _{i,j}) ≤	0,00			V _{eff} = 19,00
							Incerteza padrão combinada (u _c) =	1,52			
							Incerteza padrão expandida (U) =	5,10			U(y) = 5%
							Fator de abrangência (k) =	2,20			

u(xi) - Incerteza padrão de entrada ; u(yi) - Incerteza padrão de saída; Ci- Coeficiente de sensibilidade.

Fonte: Molognoni et al. (2019).

Na figura 6, podem-se observar as diferentes contribuições de incerteza do método para cada analito. As maiores fontes de incerteza para a maioria dos analitos foram referentes a precisão e calibração. As incertezas do tipo B foram maiores para o analito LCA. Isso foi devido ao maior número de propagação de erros e incertezas em processos de diluição. Fontes de incerteza do tipo B tendem a aumentar com o valor do mensurando. Por outro lado, incertezas do tipo A obtidas por desvios experimentais, tendem a diminuir com o passar da rotina laboratorial (MOLOGNONI et al., 2019).

Figura 5– Valores das incertezas padrão de saída ($u(y_i)$) estimadas e suas contribuições percentuais para o modelo de medição global.



Fonte: Molognoni et al. (2019).

3.5 Aplicabilidade do método

O método após ser validado foi submetido à rotina laboratorial visando cumprir seu propósito. Na maior parte das vezes, ocorre a diminuição das incertezas, tornando-o mais preciso com o aumento do número de medidas (graus de liberdade). Por outro lado, o método pode perder seletividade e exatidão ao deparar com novas matrizes. Esse fato pode ser frequente em laboratórios de análise de alimentos (MOLOGNONI et al., 2019). Nesse sentido, a avaliação de aplicabilidade do método em amostras comerciais é fundamental para testar o modelo de calibração adotado e garantir a qualidade de medição cotidianamente. Neste método foi demonstrado boa performance quando utilizado em diferentes amostras comerciais de carnes e pescados (Tabela 4). As recuperações foram consideradas aceitáveis apresentando resultados em torno de 70 a 120%. Entretanto, as amostras de *aliche* apresentaram um perfil diferente de resposta para todos os analitos quando utilizando matriz branca de atum para calibração,

apresentando baixas recuperações. Em relação aos produtos cárneos, CAD, HIS, ESPD não apresentaram boas recuperações em amostras fermentadas e curadas (peperoni) utilizado carne cozida (*corned beef*) como amostra na calibração. Esses resultados demonstram a diversidade das matrizes encaminhadas a laboratórios de controle apesar de serem enquadrados todas como cárneos e pescados. Nesse caso, mesmo que exigindo mais trabalho, os resultados demonstraram a necessidade da adição de padrão em amostras de *aliche* e peperoni até que amostras comerciais sejam enquadradas com matrizes brancas pela qualidade laboratorial.

Por fim, os resultados das amostras apresentaram um grande número de não conformidades em produtos cárneos em relação à adição de SOR. Do total de 15 amostras de salsicha avaliadas, 12 resultados foram considerados positivos. Também foi encontrado SOR irregularmente em outros produtos como mortadelas, costelas defumadas, salames, kani e de forma espantosa em enlatados. Apesar da baixa toxicidade e de reconhecida segurança como conservantes, altas concentrações de sorbato em alimentos podem gerar casos de intolerância idiossincrática, urticárias e pseudo alergias (DEUEL et al., 1954; HANNUKSELA; HAAHTELA, 1987; JUHLIN, 1981; WALKER, 1990; LENNERZ et al., 2015). O analito BEN também obteve resultados positivos em amostras de salsicha. Estudos recentes demonstram preocupação em utilizar benzoíco como conservantes em alimentos. Apesar do uso de BEN ser considerado seguro, hipótese sobre possíveis efeitos genotóxicos em células humanas foram levantadas (LENNERZ et al., 2015). Por outro lado, os conservantes MtP, EtP, PrP, BuP, NAT, HMT e NIS não foram quantificados em nenhuma das amostras. LCA e CTA podem estar naturalmente presentes nesse tipo de alimento e apresentaram valores coerentes e comparáveis com a literatura. CTA apresentou valores em torno de 100 mg kg⁻¹ em produtos *in natura* e 7336 mg kg⁻¹ em produtos processados. Já o LCA apresentou resultados em torno de 1,00 g 100 g⁻¹. Por outro lado, as demais BAs obtiveram resultados quantificáveis para a maioria dos produtos. A HIS não foi detectada em nenhuma das amostras de pescado analisadas. Os maiores resultados foram para CAD, SPD e TIR em intervalos de concentração de 26,4 a 261,2 mg kg⁻¹). Aplicabilidade do método para amostras reais revelou um perfil interessante sobre conservantes e aminas biogênicas marcadoras da qualidade sanitária. Isso porque produtos fabricados com baixo rigor de higiene e matéria prima podem gerar risco a segurança alimentar utilizando-se abusivamente de substâncias antimicrobianas.

Tabela 4 – Resultados da aplicabilidade do método em análises de rotina.

Continua

Analito	Parâmetro	Tipos de amostras (n = número de amostras analisadas)											
		1 (n = 15)	2 (n = 3)	3 (n = 2)	4 (n = 20)	5 (n = 3)	6 (n = 2)	7 (n = 3)	8 (n = 3)	9 (n = 5)	10 (n = 20)	11 (n = 9)	12 (n = 3)
SOR	Resultados em mg kg ⁻¹	287,0	186,8	84,46	NQ	NQ	NQ	322,3	23,80	8,350	NQ	NQ	--
	Rec (%)	88,7	103	95,5	107	105	103	102	101,7	8,95	80,1	77,2	52,1
BEN	Resultados em mg kg ⁻¹	82,73	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	--
	Rec (%)	101	95,9	95,2	110	117	95,9	89,8	92,6	105	82,2	85,0	51,3
HMT	Resultados em mg kg ⁻¹	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	--
	Rec (%)	103	99,7	93,2	92,1	106	99,7	81,4	100	85,3	105	86,1	20,9
NAT	Resultados em mg kg ⁻¹	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	1,250	NQ	NQ	NQ	--
	Rec (%)	82,2	72,7	82,1	85,8	83,7	72,7	73,2	75,2	71,2	84,2	83,8	66,4
NIS	Resultados em mg kg ⁻¹	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	--
	Rec (%)	80,6	76,6	96,8	76,0	82,9	76,6	85,9	84,8	78,1	90,1	93,1	279
CTA	Resultados em mg kg ⁻¹	0,0100	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,640	0,00300	0,00100	0,700	--
	Rec (%)	117	128	129	79,7	120	128	96,6	130	110	100	126	378
LCA	Resultados em mg kg ⁻¹	0,660	0,710	0,850	0,610	1,100	0,260	0,750	1,240	1,120	0,670	1,250	--
	Rec (%)	83,1	106,3	90,8	72,1	86,2	106,3	78,8	86,5	129,1	89,2	89,0	51,2
MtP	Resultados em mg kg ⁻¹	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	--
	Rec (%)	94,5	92,5	95,0	94,0	103	92,5	108	89,0	82,8	86,8	79,8	49,8
EtP	Resultados em mg kg ⁻¹	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	--
	Rec (%)	92,4	90,6	88,6	85,1	106	90,6	95,3	83,2	82,7	81,0	79,8	47,8
PrP	Resultados em mg kg ⁻¹	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	--
	Rec (%)	84,2	84,9	88,2	95,6	109	84,9	92,4	92,9	76,1	90,4	83,8	4,2
BuP	Resultados em mg kg ⁻¹	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	--
	Rec (%)	91,0	92,2	93,2	96,5	111	92,2	95,2	93,7	78,6	89,0	89,0	51,2
CAD	Resultados em mg kg ⁻¹	128,9	105,8	NQ	58,40	NQ	NQ	94,90	151,1	NQ	NQ	26,40	--
	Rec (%)	82,9	89,0	86,5	119	91,2	89,0	57,8	77,3	81,8	97,4	98,3	45,8
HIS	Resultados em mg kg ⁻¹	55,00	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	--
	Rec (%)	87,3	75,9	100	108	103	75,9	56,3	130	94,1	99,8	99,7	358
PUT	Resultados em mg kg ⁻¹	109,8	26,70	NQ	NQ	54,14	NQ	NQ	123,70	111,4	NQ	NQ	--
	Rec (%)	105	109	111	104	122	106	116	95,8	103	105	109	32,33
SPD	Resultados em mg kg ⁻¹	208,9	61,32	NQ	NQ	38,91	NQ	53,60	164,1	NQ	58,98	59,79	--
	Rec (%)	70,8	110	128	130	130	110	155	112	119	80,4	77,4	73,0
SP	Resultados em mg kg ⁻¹	234,2	131,6	NQ	NQ	NQ	NQ	261,2	63,36	NQ	NQ	28,90	--
	Rec (%)	127	93,4	128	96,0	128	93,4	58,2	89,0	108	109	101	20,9

Tabela 4 – Resultados da aplicabilidade do método em análises de rotina.

Conclusão

Analito	Parâmetro	Tipos de amostras (n = número de amostras analisadas)											
		1 (n = 15)	2 (n = 3)	3 (n = 2)	4 (n = 20)	5 (n = 3)	6 (n = 2)	7 (n = 3)	8 (n = 3)	9 (n = 5)	10 (n = 20)	11 (n = 9)	12 (n = 3)
TIR	Resultados em mg kg ⁻¹	198,9	37,08	NQ	NQ	NQ	NQ	27,30	134,9	NQ	NQ	NQ	--
	Rec (%)	71,6	91,4	108	122	118	91,4	75,0	88,5	82,8	98,0	99,1	9,6

Tipos de amostras: 1 – salsichas e mortadelas, 2 – presunto cozido, 3 – bacon, 4 – *jerked beef*, 5 – *beef jerky*, 6 – *canned roast beef*, 7 – peperoni, 8 – salame e copa, 9 – calabresa, 10 – atum (n = 15); bonito (n = 2) e anchova (n = 3), 11 – sardinha enlatada, 12 – alicci. NQ: Não quantificável.

Rec (%) - taxas de recuperação de amostras fortificadas, interpoladas em curvas de calibração matriciais de carne enlatada (para produtos cárneos) e atum (pescados). Incertezas relativas (k = 2,00): ácido sórbico e seus sais (SOR) 9,1%; ácido benzóico e seus sais (BEN) 9,9%; hexametilenotetramina (HMT) 8,6%; natamicina (NAT) 5,1%; nisina (NIS) 38,3%; ácido cítrico e seus sais (CTA) 8,9%; ácido láctico e seus sais (LCA) 9,1%; metil-parabeno (MtP) 5,1%; etilparabeno (EtP) 5,1%; propil-parabeno (PrP) 5,1%; butil-parabeno (BuP) 5,1%; cadaverina (CAD) 8,9%; histamina (HIS) 5,1%; putrescina (PUT) 5,1%; espermidina (SPD) 9,2%; espermina (SP) 9,2%; tiramina (TIR) 5,1%.

Fonte: Molognoni et al. (2019).

4 CONCLUSÃO

Desenvolveu-se com êxito um método analítico capaz de determinar moléculas com distintas características em vários tipos de matrizes alimentares de origem animal, através de único método de extração e separação cromatográfica. A aplicabilidade do método a amostras reais revelou um perfil interessante de conservantes e amins biogênicas, corroborando a necessidade do aprimoramento dos métodos analíticos atuais. Diferentes abordagens foram projetadas para o cálculo da incerteza de medição, permitindo a produção de medidas completas e de confiabilidade. Este método pode substituir pelo menos quatro outros procedimentos analíticos, resultando em uma ferramenta útil para laboratórios de controle. Pode ser usado como um método de triagem ou confirmatório, produzindo resultados qualitativos e quantitativos dependendo da matriz, analito e propósito.

REFERÊNCIAS

- ALONSO-LOMILLO, M. et al. Disposable biosensors for determination of biogenic amines. *Analytica Chimica Acta*, v. 665, n. 1, p. 26-31, 2010.
- AN, D. et al. Determination of biogenic amines in oysters by capillary electrophoresis coupled with electrochemiluminescence. *Food Chemistry*, v. 168, p. 1-6, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *NBR ISO/IEC 17025:2017*: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2017.
- BACH, B. et al. Validation of a method for the analysis of biogenic amines: Histamine instability during wine sample storage. *Analytica Chimica Acta*, v. 732, p. 114-119, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 272, de 14 de março de 2019. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Brasília: Diário Oficial da União (Seção 1), ed. 52, p. 194.
- BULUSHI, I. et al. 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.
- COÏSSON, J. Production of biogenic amines in “Salamini italiani alla cacciatora PDO”. *Meat Science*, v. 67, n. 2, p. 343-349, 2004.
- COLLINS, J.; NOERRUNG, B.; BUDKA, H. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, v. 9, n. 10, p. 2393, 2011.
- CZAJKOWSKA-MYSŁEK, A.; LESZCZYŃSKA, J. Risk assessment related to biogenic amines occurrence in ready-to-eat baby foods. *Food and Chemical Toxicology*, v. 105, p. 82-92, 2017.
- DARBRE, P.; HARVEY, P. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of Applied Toxicology*, v. 28, n. 5, p. 561-578, 2008.
- DARBRE, P. et al. Concentrations of parabens in human breast tumours. *Journal of Applied Toxicology*, v. 24, n. 1, p. 5-13, 2004.
- DEUEL, H. et al. SORBIC ACID AS A FUNGISTATIC AGENT FOR FOODS. *Journal of Food Science*, v. 19, n. 1-6, p. 13-19, 1954.

GUARINO, C. et al. Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses. *Food Chemistry*, v. 127, n. 3, p. 1294-1299, 2011.

HALÁSZ, A. et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, v. 5, n. 2, p. 42-49, 1994.

HANNUKSELA, M.; HAAHTELA, T. Hypersensitivity reactions to food additives. *Allergy*, v. 42, n. 8, p. 561-575, 1987.

HERRERO, A. et al. A new multiresponse optimization approach in combination with a D-Optimal experimental design for the determination of biogenic amines in fish by HPLC-FLD. *Analytica Chimica Acta*, v. 945, p. 31-38, 2016.

HOFF, R. et al. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. *Talanta*, v. 132, p. 443-450, 2015.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *GUIDE 98-3:2008: Uncertainty of Measurement - Part 3: Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM: 1995)*. 1 ed. Genève, Switzerland. p. 120, 2008.

JIA, S. et al. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 51, p. 9174-9182, 2011.

JUHLIN, L. Recurrent urticaria: clinical investigation of 330 patients. *British Journal of Dermatology*, v. 104, n. 4, p. 369-381, 1981.

KIRKLAND, J.; GLAJCH, J.; FARLEE, R. Synthesis and characterization of highly stable bonded phases for high-performance liquid chromatography column packings. *Analytical Chemistry*, v. 61, n. 1, p. 2-11, 1989.

LADERO, V. et al. Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Current Nutrition & Food Science*, v. 6, n. 2, p. 145-156, 2010.

LENNERZ, B. et al. Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 114, n. 1, p. 73-79, 2015.

LI, T.; XIE, H.; FU, Z. Micellar electrokinetic chromatography-chemiluminescent detection of biogenic amines using N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol as derivatization reagent and trivalent copper chelate as chemiluminescence enhancer. *Analytica Chimica Acta*, v. 719, p. 82-86, 2012.

MARTÍNEZ, M. et al. Effect of natamycin on cytochrome P450 enzymes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 62, p. 281-284, 2013.

MILLÁN, SILVIA et al. Simple and rapid determination of biogenic amines in wine by liquid chromatography–electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 584, n. 1, p. 145-152, 2007.

MOLOGNONI, L. et al. A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. *Talanta*, v. 178, p. 1053-1066, 2018.

MOLOGNONI, L. et al. A simple and fast method for the inspection of preservatives in cheeses and cream by liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 147, p. 370-382, 2016a.

MOLOGNONI, L. et al. Development of a LC–MS/MS method for the simultaneous determination of sorbic acid, natamycin and tylosin in Dulce de leche. *Food Chemistry*, v. 211, p. 748-756, 2016b.

MOLOGNONI, L. et al. Influence of method validation parameters in the measurement uncertainty estimation by experimental approaches in food preservatives analysis. *Food Chemistry*, v. 282, p. 147-152, 2019.

MOLOGNONI, L. et al. The role of measurement uncertainty in the conformity assessment of the chemical composition of feeds. *Microchemical Journal*, v. 131, p. 79-91, 2017.

NEDELJKO, P.; TUREL, M.; LOBNIK, A. Hybrid sol-gel based sensor layers for optical determination of biogenic amines. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 246, p. 1066-1073, 2017.

OHTSUKI, T. et al. Absolute quantitative analysis for sorbic acid in processed foods using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, v. 734, p. 54-61, 2012.

ORDÓÑEZ, J. et al. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 939, p. 10-25, 2016.

PABLO, M. A et al. Evaluation of immunomodulatory effects of nisin-containing diets on mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 24, n. 1, p. 35-42, 1999.

REDRUELLO, B. et al. A UHPLC method for the simultaneous analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ions in beer. *Food Chemistry*, v. 217, p. 117-124, 2017.

SAGRATINI, G. et al. 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.

SANTOS, J. et al. Scope extension validation of a LC-MS method for the inspection of preservatives in butter. *Food Control*, v. 67, p. 209-215, 2016.

SHALABY, A. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SIROCCHI, V. et al. Simultaneous determination of ten underivatized biogenic amines in meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry*, v. 49, n. 9, p. 819-825, 2014.

TEN BRINK, B. et al. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 73-84, 1990.

VALESE, A. et al. Development, validation and different approaches for the measurement uncertainty of a multi-class veterinary drugs residues LC-MS method for feeds. *Journal of Chromatography B*, v. 1053, p. 48-59, 2017.

WALKER, R. Toxicology of sorbic acid and sorbates. *Food Additives and Contaminants*, v. 7, n. 5, p. 671-676, 1990.

**CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DOS MUTAGÊNICOS ÁCIDO
ETILNITRÓLICO E 2-METIL-1,4-DINITRO PIRROL EM PRODUTOS
CÁRNEOS: ABORDAGENS DE SÍNTESE, EXTRAÇÃO E ANÁLISE
SIMULTÂNEA POR LC-MS/MS**

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

No presente capítulo foi demonstrado o desenvolvimento e a validação de uma ferramenta analítica sensível capaz de analisar concentrações em $\mu\text{g kg}^{-1}$ dos mutagênicos ácido etilnitrólico (ENA) e 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP) em produtos cárneos. Para isso, uma vasta gama de instrumentações analíticas e abordagens experimentais foram empregadas. A inovação química proposta por este capítulo gerou uma publicação no periódico *Talanta* e um no *Journal of Chromatography A*.

Artigos publicados:

MOLOGNONI, L. et al. Development of a new analytical tool for assessing the mutagen 2-methyl-1,4-dinitro pyrrole in meat products by LC-ESI-MS/MS. *Talanta*, v. 185, p. 151-159, 2018. Doi: 10.1016/j.talanta.2018.03.035.

Molognoni, L., et al. Assessing the mutagens ethylnitrolic acid and 2-methyl-1, 4-dinitro pyrrole in meat products: sample preparation and simultaneous analysis by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography A*, 460512, 2019. Doi: 10.1016/j.chroma.2019.460512.

RESUMO

O uso conjunto dos conservantes sorbato e nitrito no processamento de carnes pode levar à formação dos compostos mutagênicos 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP) e o ácido etilnitroso (ENA). Este capítulo teve por objetivo desenvolver e validar métodos analíticos para quantificar DNMP e ENA em carnes processadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Para isso, abordagens experimentais de síntese orgânica, extração e quantificação foram desenvolvidas e reproduzidas da literatura. A validação do método foi realizada em conformidade com as diretrizes da Decisão 2002/657/UE e a aplicabilidade verificada em diversas categorias de produtos cárneos. Um único procedimento de extração e método cromatográfico foi aplicado com sucesso para análise dos mutagênicos. Amostras de bacon, salsicha e mortadela produziram as maiores concentrações de DNMP e patê de frango e mortadela apresentaram resultados positivos para ENA. Os métodos desenvolvidos provaram ferramentas confiáveis, seletivas e sensíveis para medidas de DNMP e ENA em produtos cárneos.

Palavras-chave: Validação analítica. Decisão 2002/657/EU. Segurança alimentar. Conservantes de alimentos. Incerteza de medição.

ABSTRACT

The use of sorbate and nitrite in meat processing may lead to the formation of 2-methyl-1,4-dinitro pyrrole (DNMP) and ethylnitrolic acid (ENA), a mutagenic compounds. This work was aimed at developing and validating an analytical method for the quantitation of DNMP and ENA by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. For this, experimental approaches of organic synthesis, extraction and quantification were developed and reproduced from the literature. Validation was performed in accordance to Commission Decision 2002/657/EU and method applicability was checked in several samples of meat products. A single extraction procedure and chromatographic method was successfully applied for mutagen analysis. Samples of bacon and cooked sausage yielded the highest concentrations of DNMP and chicken *pâté* and mortadella tested positive for ENA. The developed method proved to be a reliable, selective, and sensitive tool for DNMP and ENA measurements in meat products.

Keywords: Analytical validation. Decision 2002/657/EU. Food safety. Food preservatives. Measurement uncertainty.

1 INTRODUÇÃO

O uso de conservantes consiste em uma das principais estratégias utilizadas pela indústria de alimentos visando ação antimicrobiana. Nos anos 80, os efeitos sinérgicos do nitrito de sódio com o sorbato de potássio na conservação de produtos cárneos foram investigados. Vantagens como a extensão da vida de prateleira, prevenção de patógenos (*Clostridium botulinum*), redução na quantidade de sais de cura e inibição da microbiota deteriorante em embutidos fermentados foram reveladas (ROBACH; STATELER, 1980; ROBACH; SOFOS, 1982; SOFOS, 1985; DROSINOS et al., 2006). Entretanto, as reações formaram o ácido etilnitroso (ENA) e o 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP), compostos com propriedade mutagênicas do DNA (KADA, 1974; NAMIKI et al., 1980).

Apesar da escassez de estudos relacionados à formação desses compostos em condições reais de processamento de carnes, os últimos dados da literatura demonstram que o ENA possui uma reatividade de pelo menos 40 vezes superior à do ácido sórbico sozinho, e de 30 vezes em relação ao íon nitrito (EFSA, 2015). Os compostos apresentaram ação genotóxica e mutagênica, em testes *rec-assay* bacteriano com *Bacillus subtilis* e Ames frente a *Salmonella typhimurium* (KADA, 1974; NAMIKI et al., 1980; MUKHERJEE et al., 1988; HANSEN; TANNENBAUM; ARCHER, 1981). DNMP demonstrou maior reatividade em relação a outros tipos de pirróis sem o grupo nitro ligado ao heterocíclico. DNMP apresentou poder de alquilação sobre o nucleófilo 4-(p-nitrobenzil)-piridina, uma armadilha para agentes alquilantes com características semelhantes às das bases de DNA (PÉREZ-PRIOR et al., 2010).

Cromatografia em camada delgada (TLC, *thin-layer chromatography*) e cromatografia líquida com detecção UV (LC-UV, *liquid chromatography-UV*) foram as primeiras abordagens analíticas utilizadas para identificação do ENA e DNMP. Kito et al. (1978), utilizaram TLC para caracterizar o mutagênico em estudo pioneiro. O grupo de pesquisa aperfeiçoou as medidas após alguns anos, empregando maior seletividade através de medidas por LC-UV (NAMIKI et al., 1980). No entanto, devido à necessidade de caracterizar os compostos após sua síntese, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (KITO; NAMIKI; TSUJI, 1978; BINSTOK et al., 1998; PÉREZ-PRIOR et al., 2008), espectrometria de absorção molecular UV (Pérez-Prior et al., 2008; PÉREZ-PRIOR et al., 2010), espectroscopia no infravermelho (OSAWA et al., 1986; BINSTOK

et al., 1998), análises poligráficas (OSAWA; NAMIKI, 1982) e espectrometria de massas (MS) (PÉREZ-PRIOR et al., 2008; BINSTOK et al., 1998; PÉREZ-PRIOR et al., 2010; MOLOGNONI et al., 2018a) também foram utilizadas. Por outro lado, LC-UV foi utilizada na quantificação desses compostos (OSAWA; NAMIKI, 1982; BINSTOK et al., 1998; PÉREZ-PRIOR et al., 2010). Entretanto, muitos desses métodos disponíveis na literatura não atendem mais às atuais expectativas e exigências do controle rigoroso de alimentos, que requerem medidas quantitativas de alta sensibilidade, seletividade e exatidão. No entanto, os métodos disponíveis são utilizados como base para o desenvolvimento de novas abordagens analíticas modernas.

Esta tese contribuiu com os primeiros métodos sensíveis capazes de analisar ENA e DNMP em carnes processadas. Consequentemente, ainda faltam dados sobre a presença, formação, estabilidade e riscos sobre o consumo desse compostos em produtos cárneos (EFSA, 2015). Dados de confiabilidade sobre compostos que ofereçam riscos à saúde do consumidores são de extrema importância, uma vez que se tornam a base para a consolidação de ações preventivas e classificações de risco por órgãos competentes. As características físico-químicas, a complexidade de matrizes alimentares industrializadas, falta de padrões comerciais e de dados disponíveis tornam análises de ENA e DNMP em produtos cárneos um desafio analítico.

Diante desse contexto, este capítulo teve por objetivo o desenvolvimento e a validação de um método analítico para determinação simultânea do ENA e DNMP (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) em produtos cárneos. Para isso, abordagens experimentais de síntese orgânica, técnicas de extração e modos de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foram testadas para obter maior seletividade, sensibilidade e reprodutibilidade analítica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padrões comerciais e reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, e os padrões com no mínimo 96% pureza. Nitrito de sódio (NIT), nitrato de sódio (NAT), sorbato de potássio (SOR), ácido pipecólico (PIC), 1-metilimidazol (1-MEI), cloreto de 3,5-dinitro benzoico

(3,5-DNB), tetrametilsilano (TMS) foram todos fornecidos por Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Alemanha). *N*-nitrosopirrolidina deuterada (NPYR-d4) foi fornecida pela CDN Iso-topes (Quebec, Canada). Metanol, acetonitrila, acetato de etila, hexano, benzeno, clorofórmio deuterado e diclorometano foram fornecidos por Merck KGaA (Alemanha). Ácidos fórmico, sulfúrico e clorídrico fornecidos por J.T. Baker Chemical Co. (EUA). Toda água foi ultrapura produzida pelo sistema de purificação Milli-Q (França).

Soluções estoque 1000 mg L^{-1} dos padrões foram preparadas dissolvendo-os em metanol com auxílio de ultrassom. As soluções de fortificação foram preparadas a partir das soluções estoque em acetonitrila. PIC na concentração de 100 mg L^{-1} , 1-MEI 3,5-DNB e NPYR-d4 em 10 mg L^{-1} . Todas as soluções foram estocadas a $-30 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2 Síntese dos mutagênicos

A síntese do DNMP foi conduzida de acordo com Kito et al. (1978) e Namiki et al. (1980). Duas soluções foram preparadas separadamente, dissolvendo-se 16,5 g de nitrito de sódio em 64 mL de água e 4,41 g de sorbato de potássio em 1300 mL de água. As duas soluções foram misturadas e aquecidas à temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante duas horas, mantendo-se o pH em torno de 3,5 através do gotejamento de solução de ácido sulfúrico 2 mol L^{-1} , controlado por um potenciômetro. Procedeu-se à partição com diclorometano em funil de separação, adicionando-se cinco volumes de 75 mL. A fração precipitada, de coloração amarela (fase orgânica), foi lavada com duas porções de 100 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. Em seguida, foi seca em sulfato de sódio e carvão ativo, filtrada e evaporada em rota-evaporador. Foram obtidos cerca de 200 mg do composto.

A síntese do ENA foi conduzida com adaptações do método descrito por Pérez-Prior et al. (2008). Um volume de nitroetano (8 mL) foi adicionado a uma solução de hidróxido de potássio 1 mol L^{-1} (100 mL). Um total de 8,90 g de nitrito de sódio foi solubilizado nessa solução em meio controlado a $0 \text{ }^\circ\text{C}$. Solução de ácido sulfúrico 5 mol L^{-1} foi gotejada para manter o pH do meio em 4,2, controlado por um potenciômetro. Procedeu-se à partição com éter etílico em funil de separação, adicionando-se cinco volumes de 50 mL. Em seguida, a fase orgânica obtida foi seca em sulfato de sódio e carvão ativado e filtrada. Por fim, o produto foi recristalizado utilizando clorofórmio.

O *N*-nitrosopipecólico (N-PIP) foi sintetizado de acordo com Lijinsky, Keefer e Loo (1979), dissolvendo 3,00 g de PIC racêmico em 30 mL de ácido clorídrico em banho de gelo. Em seguida, 2,20 g de nitrito de sódio foram dissolvidos lentamente na solução e a mistura foi transferida para um funil de separação. A partição foi realizada com cinco volumes de 75 mL de diclorometano. A fase orgânica amarelada foi seca com sulfato de sódio anidro e carvão ativado, filtrada e transferida para um balão de fundo redondo. A solução foi completamente seca sob fluxo de argônio e recristalizada utilizando benzeno.

Todos compostos sintetizados foram armazenados em frascos âmbar hermeticamente fechados em atmosfera inerte (argônio) e mantidos a -80 °C em ultrafreezer. A caracterização dos compostos foi realizada através de TLC, espectros de absorção molecular UV-Vis, ressonância magnética nuclear (RMN-1H e 13C) e espectro de massas (MS).

O espectro de absorção molecular foi obtido após separação cromatográfica em fase reversa com Venusil XPB C18 como fase estacionária (150 mm x 4,6 mm, 5 µm tamanho de partícula (Bonna-Agela Technologies Inc., EUA) e metanol 70% como fase móvel, em modo isocrático. A varredura de absorbância foi realizada em comprimentos de onda de 190 a 400 nm no sistema de cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) Alliance 2695 (Waters Corporation, EUA). A pureza dos compostos foi determinada PELA pureza do pico utilizando o comprimento de maior absorvidade de cada composto.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foram obtidos no espectrômetro Bruker Avance 200, operando em 200 MHz. Cerca de 20 mg dos compostos foram dissolvidos em clorofórmio deuterado e TMS como padrão interno. Os deslocamentos químicos (δ) em partes por milhão (ppm) da frequência de operação em relação ao TMS foram determinados. Para isso, a multiplicidade (s = singleto, d = dubleto, dd = duplo dubleto, t = tripleto, m = multiplete, sl = singleto largo), o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa e a constante de acoplamento (J) expressa em Hertz (Hz) foram determinadas.

Os espectros de massas dos íons moleculares e de seus produtos de fragmentação foram obtidas por infusão direta no espectrômetro de massas tipo triplo-quadrupolo Sciex 5500 Qtrap (EUA). Os compostos foram dissolvidos em solução de MeOH a 50% e acidificados com 0,1% de ácido fórmico (DNMP) e 2 mmol L⁻¹ de formiato de amônio

(ENA) e infundidos separadamente por um fluxo contínuo de $10 \mu\text{L min}^{-1}$. A caracterização dos compostos foi realizado através do monitoramento múltiplo de reações e íons precursor utilizando armadilha de íons.

2.3 Amostras utilizadas no desenvolvimento, validação e aplicabilidade do método

No total, 70 amostras comerciais de produtos cárneos fermentados, curados, secos e cozidos foram avaliadas durante o desenvolvimento, validação e aplicabilidade do método. Todas as amostras foram processadas por fábricas brasileiras sob inspeção federal. Todas as amostras foram congeladas, moídas e homogeneizadas em moinho de discos e processador de alimentos. Todas amostras foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas a $-80 \pm 10^\circ \text{C}$ até o final do estudo.

Por outro lado, para o desenvolvimento do método de extração amostras de mortadela foram processadas em uma planta piloto sob as melhores condições para a formação do analito, de acordo com Namiki et al. (1980) e Binstok et al. (1998). Para isso, foram utilizadas proporções de 8:1 (0,3000%:0,0375%, m/m) e 2:1 (0,30%:0,15%, m/m) de NIT e SOR, respectivamente. Glucona-delta-lactona (1,5%) e ácido fosfórico de grau alimentício (0,25%) foram usados para manter o pH da emulsão de carne em torno de $5,0 \pm 0,5$. A composição da mortadela consistiu de carne mecanicamente separada de frango (60%), carne de suíno (26%), proteína de soja texturizada (3,5%), fécula de mandioca (5%), cloreto de sódio (3,5%), sacarose (0,6%) e pirofosfato de sódio (0,3%).

2.4 Abordagens experimentais de extração

O desenvolvimento do método de extração foi realizado em três etapas distintas: 1ª obtenção de uma condição inicial para os testes (seleção das variáveis), 2ª aplicação de diferentes técnicas de extração e 3ª seleção e otimização do método de extração para a validação analítica.

1ª Etapa: um planejamento fatorial saturado de design 2^{7-4} foi empregado para visualizar os efeitos das variáveis de extração selecionadas, visando obter uma condição inicial para os experimentos. Empregando extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura (SLE-LTP) foram testadas as variáveis (1): massa de amostra (1 e 2 g); (2):

solvente de extração (metanol e acetonitrila); (3): proporção aquosa no solvente de extração (10 e 80%), (4): uso de ácido fórmico (< pka ENA) e ácido acético (> pka ENA), (5): clean-up com solvente apolar (hexano e acetato de etila), (6): uso ou não de amônio na reconstituição do extrato seco (acetato de amônio em 10 mM) e (7): proporção de orgânico na reconstituição do extrato seco (MeOH e ACN, em 70%). Utilizando estatística robusta, o experimento foi conduzido de acordo com a matriz projetada de acordo com a equação 1.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad (i = 1, \dots, k) \quad (1)$$

Onde Y: é a função alvo estimada; β_0 : constante; β_i : coeficiente de regressão; X_i : variável independente; k: número de variáveis.

O método de Lenth foi usado para estimar os principais efeitos das variáveis no procedimento de extração (LENTH, 1989). O erro da margem dos contrastes (ME), o erro pseudo-padrão (PSE) e simultâneos (SME) foram calculados com 95% de probabilidade, utilizando o software Microsoft Excel.

2ª Etapa: após consolidar as variáveis de extração, diferentes técnicas de extração forma testadas. Extração em fase sólida (SPE), fase sólida dispersiva (d-SPE) tipo QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe) modificado, extração por líquido pressurizado (PLE) e SLE-LTP foram aplicadas. Cada método de extração foi realizado em triplicata independente de preparo utilizando a mortadela experimental e um branco analítico (mortadela comercial isenta dos analitos). Para isso, 2.0 ± 0.1 g de amostra foram pesadas diretamente para tubo de polipropileno 50 ml. Foram adicionados 5 mL de solução de 90% de ACN acidificada com 0,1% ácido fórmico. Exceto para PLE, solução contendo 20% ACN acidificada com ácido fórmico foi utilizada na extração (aproximadamente 15 mL). Todos os tubos, exceto para PLE, foram agitados por 20 min utilizando agitação orbital, seguida de a 3488 g-force durante 10 min a 4 ± 1 °C. O sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno de 15 mL e mantido a -30 ± 10 °C por uma hora. Foram novamente centrifugados a 3488 g-force durante 10 min a 4 ± 1 °C. Os sobrenadantes foram posteriormente tratados com dSPE.

SPE e dSPE: os extratos foram submetidos a diferentes cartuchos de extração utilizando aparato Supelco Visiprep™ SPE Vacuum Manifold, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Alemanha). Na tabela 1, são resumidos todos os materiais, reagentes e procedimentos utilizados em cada abordagem experimental.

Tabela 1– Delineamento experimentais utilizando fase sólida na extração dos analitos.

Técnica	Fase sólida	Procedimento	Condicionamento	Lavação	Eluição
QuEChERS I	100 mg carvão ativado em pó e 200 mg MgSO ₄	Foram misturados 2 minutos com agitador de tubos e centrifugados 3600 g. Filtração com PTFE 0,25 µm.	---	---	---
QuEChERS II	50 mg de PSA (<i>Primary secondary amine</i>), 100 mg de C18 e 200 mg de Na ₂ SO ₄ foram adicionados a cada tubo	Foram misturados 2 minutos com agitador de tubos e centrifugados 3600 g. Filtração com PTFE 0,25 µm.	---	---	---
SPE I	Cianopropil (Spe-ed, 500 mg/ 6 mL, Applied Separations)	Orgânico ^b	3 mL MeOH 3 mL orgânico ^b	3 mL água	3 mL MeOH
SPE I	Cianopropil (Spe-ed, 500 mg/ 6 mL, Applied Separations)	Orgânico ^b	3 mL MeOH 3 mL orgânico ^b	3 mL água	3 mL MeOH
SPE II	Troca aniônica com amina (500 mg/ 3 mL, CHROMABOND)	Orgânico ^b com 5% de amônio (pH 7)	3 mL MeOH 3 mL água	3 mL água 3 mL ACN	3 mL MeOH 2% ácido acético
SPE III	Troca aniônica com sílica protegida (500 mg/ 6 mL, CHROMABOND)	Aquoso ^a com 5% amônio (pH 7)	3 mL hexano 3 mL MeOH 3 mL água	3 mL água 3 mL ACN	3 mL MeOH 2% ácido acético
SPE IV	Polímero Strata-X (500 mg/ 6 mL, Phenomenex)	Aqueoso ^a seguida da solução utilizada no PLE	3 mL MeOH 3 mL água	3 mL água	3 mL MeOH
SPE V	Fase reversa de resina 102 (Spe-ed, 500 mg/ 6 mL, Applied Separations)	Aqueoso ^a seguida da solução utilizada no PLE	3 mL MeOH 3 mL aqueoso ^a	---	3 mL MeOH
SPE VI	Fase reversa de sílica (500 mg/ 6 mL, CHROMABOND)	Orgânico ^b	3 mL diclorometano 3 mL ACN	---	3 mL diclorometano

Onde a: ACN:H₂O (20:80) 0,05% ácido fórmico e b: ACN:H₂O (90:10) 0,05% ácido fórmico.

Fonte: Próprio Autor.

PLE: os tubos contendo as amostras foram misturados com terra de diatomácea e carvão ativado, suavemente comprimido com um pilão, evitando espaços vazios no interior da cápsula. A cápsula foi inserida em uma máquina de café expresso (Nespresso, Brasil), segundo adaptações do método descrito por Armenta, La Guardia e Esteve-

Turrillas (2016). O extrato foi coletado diretamente em um tubo de polipropileno de 50 mL e seguiu-se para os procedimentos conforme a tabela 1.

Ao final, todos os extratos, inclusive os obtidos por SLE-LTP, foram secos em fluxo de nitrogênio a 25 ± 5 °C e posteriormente ressuspensos com 1 mL de solução MeOH 70%. Clean-up da gordura utilizando 0,2 mL de n-hexano foi realizado somente para os extratos obtidos por SLE-LTP e SLE. Após agitação orbital por 5 min, os extratos foram transferidos para microtubos de polipropileno e centrifugados a 17300 g por 5 min a 4 °C. Finalmente, alíquotas foram transferidas para frascos tipo *vial* e injetadas no sistema LC-MS/MS.

Foram monitorados processos de nitroação durante o procedimento de extração, de acordo com Herrmann, Duedahl-Olesen e Granby (2014). Para isso, $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de PIC foi adicionado a cada tubo antes da extração e a formação do ácido *N*-nitroso piperólico (NPIC) foi monitorado durante os testes.

3ª Etapa: os métodos pré-selecionados na 2ª etapa foram otimizados e novamente comparados para seleção final. Nesse processo, levou-se em consideração a sensibilidade (sinal analítico), efeito de matriz na fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e a incerteza randômica do sistema LC-MS/MS (Equação 1). Além disso, o poder de limpeza do extrato também foi avaliado. Tubos contendo o extrato final foram fotografados lado a lado com tubos contendo água. A acuidade visual do analista foi aumentada utilizando estereomicroscópio Stemi 508 (Zeiss).

A incerteza padrão combinada foi determinada através de cada fonte de incerteza e posteriormente propagada em incerteza padrão expandida, de acordo com as equações 2 e 3 respectivamente.

$$u_c^2(y) = u^2_{(Sr)} + u^2_{(EME)} + \sum \frac{\partial y^2}{\partial x_i} u^2_{(xi)} \quad (2)$$

Onde u_c : incerteza padrão combinada; $u_{(Sr)}$: incerteza padrão referente aos efeitos randômicos do instrumento com injeções sucessivas; $u_{(EME)}$: incerteza padrão referente ao efeito de matriz na fonte ESI e $\sum \frac{\partial y^2}{\partial x_i} \cdot u^2_{(xi)}$: modelagem matemática referente à propagação de incertezas proveniente de instrumentos utilizados na extração.

$$U_{(y)} = u_{c(y)} \cdot k \quad (3)$$

Onde $U_{(y)}$: incerteza padrão expandida; u_c : incerteza padrão combinada e k : coeficiente de abrangência (95%).

Os detalhes sobre o cálculo de incerteza de cada fonte do modelo global podem ser vistos no material suplementar desta tese. Detalhes sobre o cálculo do parâmetro efeito de matriz são mencionados no item 2.7.

2.5 ABORDAGENS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises por LC-MS/MS foram realizadas em um espectrômetro de massas triplo quadrupolo híbrido com armadilha de íons (5500 QTrap, Sciex, EUA), equipado com fonte ESI. O espectrômetro foi acoplado a cromatografia líquida de ultra eficiência 1290 Infinity (Agilent Technologies, Alemanha). Foi utilizado o modo de monitoramento múltiplo de reações. A otimização dos parâmetros foi realizada em concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, dissolvidos em fase móvel e extrato de matriz branca. Foram testadas diversas fases estacionárias e modos cromatográficos. Foram utilizados experimentos univariados sob condição de repetitividade, fixando sempre que possível variáveis de medição como: volume de injeção (5 μL), temperatura da coluna (40 °C), fluxo (250 $\mu\text{L min}^{-1}$) e número de medições ($n = 20$). Fase móvel A: água e fase móvel B: MeOH, ambas com adição de 5 mM de acetato de amônio e 0,1% ácido acético foram utilizadas.

LC com interação hidrofílica (HILIC) foi realizada empregando uma coluna Hypersil Gold HILIC, Thermo Fisher (150 x 3,0 mm, 5 μm). O gradiente de eluição consistiu de: 5% A (1-4 min), 95% A (4-5 min), 50% A (5-6 min) e 95% A (6-8 min), mais 5 min de auto equilíbrio do sistema (total da corrida 15 min).

LC em fase reversa utilizando grupos polares (cianopropil e fenil-hexil) e apolares C18 ligados à sílica foram testados. Para isso, Zorbax 300SB-CN, Agilent (4.6 x 50 mm, 3.5 μm), Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, Agilent (3,0 x 50 mm, 4 μm) e Zorbax C18, Agilent (3,0 x 100 mm, 3,5 μm) foram utilizadas, respectivamente. O gradiente de eluição utilizado em todas as corridas consistiu de: 0-4 min (95% A), 4-6 min (10% A), 6-7 min

(50% A), 7-8 min (95% A), mais 2 min para o auto equilíbrio do sistema (total da corrida 10 min).

LC em ultra desempenho com C18 em fase reversa também foi testada. Para isso, Zorbax C18, Agilent (1,8 x 50 mm, 1,5 μm) com gradiente de eluição: 0-1 min (95% A), 2-3 min (10% A), 3-4 min (95% A), mais 1 min para o auto equilíbrio do sistema (total da corrida 5 min).

No fim, todas as abordagens de cromatografia líquida foram comparadas quanto a retenção dos analitos na fase estacionária, presença de concomitantes isobáricos, tempo de equilíbrio, resolução e incerteza de medição. A incerteza randômica foi calculada através de dados obtidos por injeções sucessivas sem o emprego de variáveis de medição. O desvio padrão da média da série de dados ($n = 20$), sem *outlier* (teste de Dixon 95%), foi expandido multiplicando-se o valor da incerteza padrão por $k = 2,0$ (95% de probabilidade de acerto em uma distribuição do tipo t-Student).

2.6 Quantificação do nitrito, nitrato e ácido sórbico

Amostras descritas no item 2.3 também foram submetidas à quantificação de NIT e NAT por eletroforese capilar por zona capilar com detecção de arranjo de diodos (CZE-DAD), conforme descrito por Della Betta et al. (2016). O SOR foi quantificado por LC-MS/MS como proposto por Molognoni et al. (2018a). Todos os resultados foram expressos em mg kg^{-1} . Ambos os métodos foram previamente validados e os seguintes limites de quantificação foram atingidos: 5,00 mg kg^{-1} (NIT), 5,00 mg kg^{-1} (NAT) e 1,00 mg kg^{-1} (SOR).

2.7 Validação do método

A validação do método foi conduzida com orientações da Decisão 2002/657/CE (EFSA, 2002).

A seletividade foi verificada pela análise de no mínimo 20 amostras brancas e comerciais de variadas classes de embutidos. Esse procedimento visou avaliar os possíveis interferentes endógenos e exógenos das matrizes, contaminações entre corridas e interferentes isobáricos. Os resultados foram avaliados pela presença de picos

interferentes em torno dos tempos de retenção dos analitos, após os mesmos serem estabelecidos utilizando padrões puros e solvente. A avaliação foi realizada comparando as corridas das amostras brancas, comerciais e experimentais (item 2.3), com e sem fortificação. Também foram utilizados valores crescentes de massa de amostra branca (gradiente de massa) para confirmar picos interferentes provenientes das matrizes.

As curvas de calibração foram preparadas utilizando padronização interna com seis níveis de concentrações (incluindo o zero). Para isso, foi utilizada relação funcional linear (não ponderada) de razão das concentrações (eixo x) versus razão de áreas dos picos (eixo y). Todas as curvas foram preparadas em triplicata de ponto. As faixas de trabalho apresentaram equidistância e compreenderam de 5 a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A linearidade do método foi avaliada através da reprodutibilidade de curvas de calibração preparadas em matriz. Para isso, foram preparadas com três repetições por nível, em dois dias distintos para todas as categorias estudadas. O critério de aceitação foi através da média dos coeficientes de regressão (R^2) que deveria ser maior que 0,98.

O efeito de matriz foi avaliado para verificar o aumento ou a supressão do sinal na presença das matrizes. O procedimento foi baseado na análise de dois tipos de curvas de calibração. A curva I consistiu em curva em solvente, preparada por diluição da solução padrão em fase móvel. Já a curva II foi realizada em matriz branca fortificada com padrões antes do procedimento de extração. A avaliação foi realizada comparando-se as derivadas das retas obtidas em matriz e solvente, de acordo com Hoff et al. (2015).

A recuperação e a precisão (em termos de repetitividade e precisão intermediária) foram determinadas a partir de matriz branca fortificada. Para isso, foram utilizados dois grupos de sete alíquotas fortificadas nos três primeiros níveis das curvas de calibração estabelecidas para cada analito. A recuperação e precisão em termos de precisão intermediária foram avaliadas empregando variáveis de medição como dias ($n = 2$) e analistas ($n = 3$). A exclusão dos erros grosseiros foi realizada empregando teste de Dixon (95%) e a verificação dos possíveis erros sistemáticos empregando gráfico de dispersão por pontos. Os resultados foram obtidos através de curvas de calibração em matriz preparadas em triplicata de ponto, no mesmo dia do experimento para cada matriz. A avaliação da recuperação foi realizada pela taxa de recuperação, com limites aceitos de -20% a +10%. Já para precisão foram considerados satisfatórios os resultados com $CV < 20\%$.

O limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) foi determinado como a menor quantidade detectada com incerteza abaixo de 40%. A capacidade de decisão ($CC\alpha$) foi obtida pela multiplicação do desvio-padrão da média das fortificações durante a validação, pelo fator 1,64 e ponderado na média geral. Já a capacidade de detecção ($CC\beta$), foi obtida pela multiplicação do desvio-padrão pelo fator 1,64 e somando ao valor de $CC\alpha$. Esses parâmetros foram calculados considerando o primeiro nível de quantificação.

2.8 Estimativa da incerteza global

A estimativa da incerteza de medição global do método desenvolvido foi realizada utilizando modelagem matemática. O modelo de medição utilizado padronização interna foi de acordo com a equação 4.

$$C \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{\left(\frac{A_{\text{analito}}}{A_{\text{PI}}} - b\right) \cdot C_{\text{PI}} \cdot V}{a \cdot m} \quad (4)$$

Onde: $C_{\text{mg kg}^{-1}}$: concentração do analito na solução estoque (mg kg^{-1}); m : massa da amostra (g); A_{analito} : área do analito (a.u.); A_{PI} : área do padrão interno (a.u.); C_{PI} : concentração do padrão interno na solução de extração (mg kg^{-1}); V : volume da solução de extração (mL); a : coeficiente angular e b : coeficiente linear da curva analítica.

A determinação da incerteza padrão combinada foi calculada de acordo com a propagação de todas as fontes de incerteza, conforme a equação 5.

$$\begin{aligned}
& u^2(f(A_{\text{analito}}, A_{\text{PI}}, C_{\text{IS}}, a, b, m, V)) \\
&= \left(\frac{\partial f}{\partial A_{\text{analito}}}\right)^2 \cdot (\sigma A_{\text{analito}})^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial A_{\text{PI}}}\right)^2 \cdot (\sigma A_{\text{PI}})^2 \\
&+ \left(\frac{\partial f}{\partial C_{\text{PI}}}\right)^2 \cdot (\sigma C_{\text{PI}})^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial a}\right)^2 \cdot (\sigma a)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial b}\right)^2 \cdot (\sigma b)^2 \\
&+ \left(\frac{\partial f}{\partial m}\right)^2 \cdot (\sigma m)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial V}\right)^2 \cdot (\sigma V)^2 \\
&+ 2 \cdot \left(\frac{\partial f}{\partial A_{\text{analito}}}\right) \cdot (\sigma A_{\text{analito}}) \cdot \left(\frac{\partial f}{\partial A_{\text{PI}}}\right) \cdot (\sigma A_{\text{PI}}) \cdot r_{A_{\text{analito}}, A_{\text{PI}}} \\
&+ 2 \cdot \left(\frac{\partial f}{\partial a}\right) \cdot (\sigma a) \cdot \left(\frac{\partial f}{\partial b}\right) \cdot (\sigma b) \cdot r_{a,b}
\end{aligned} \tag{5}$$

Onde u^2 : incerteza padrão combinada; $A_{\text{analito}}, A_{\text{PI}}, C_{\text{IS}}, a, b, m, V$: variáveis de medição do modelo global em unidades u.a, u.a, mg kg⁻¹, u.a mg⁻¹ kg, u.a, g, mL, respectivamente; $(\sigma x_i)^2$: incerteza padrão de saída e $\frac{\partial f^2}{\partial x_i}, \frac{\partial f}{\partial x_j}$: coeficientes de sensibilidade e $r_{i,j}$: coeficiente de correlação estimado.

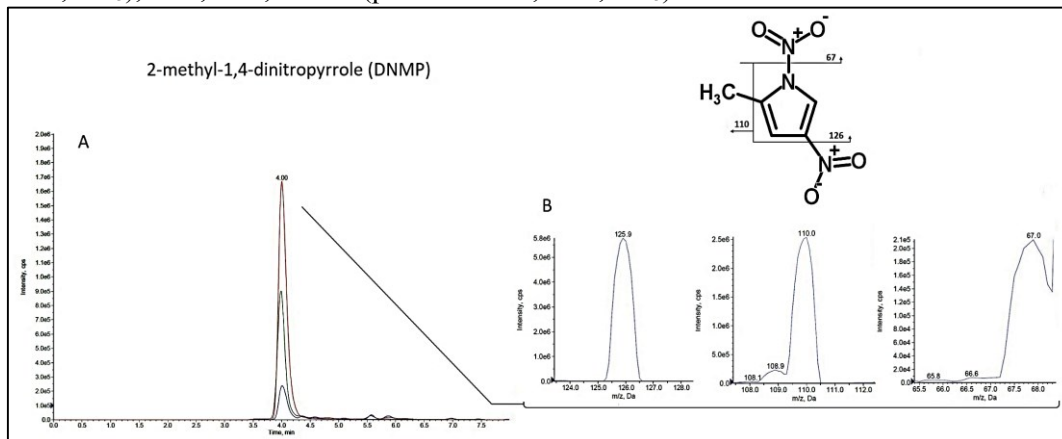
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese dos compostos e caracterização

A síntese de ENA produziu cristais higroscópicos de aparência incolor, cujos deslocamentos químicos e parâmetros de multiplicidade do espectro de RMN 1H estavam em conformidade com sua estrutura química e com os dados da literatura (PÉREZ-PRIOR et al., 2010). Os deslocamentos químicos (δ) do RMN de ¹³C foram 10,45 e 159,9 ppm. Por outro lado, a síntese do DNMP produziu um produto sólido de cor amarelo pálido, cujo espectro de RMN 1H se adequou à sua estrutura, como previamente publicado por Molognoni et al. (2018b).

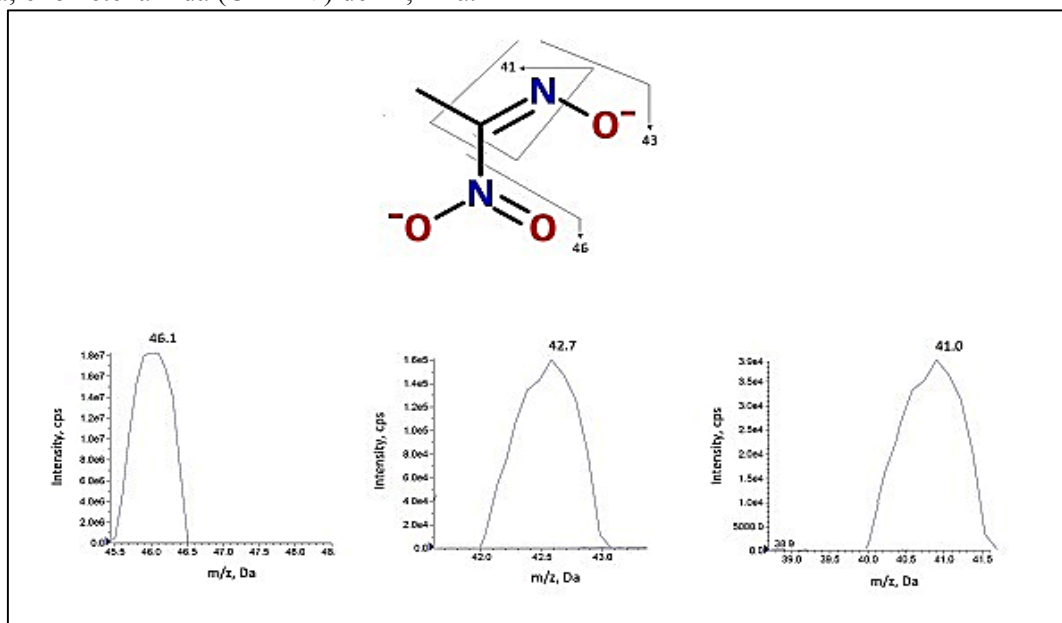
A absorção molecular apresentou maior absorvidade nos comprimentos de onda de 209 e 240 nm para o DNMP e ENA, respectivamente. Esses valores são condizentes com os dados relatados por Pérez-Prior et al. (2010). Já os espectros de massa foram pela primeira vez foram explorados com esse propósito. Apesar desses resultados serem mais discutidos no item 3.3, os resultados prévios demonstram íons precursores, fragmentos e propriedades físico-químicas condizentes com as moléculas sintetizadas, conforme demonstrado na figura 3 e 4.

Figura 1– Caracterização do DNMP por LC-MS/MS, em que A: cromatograma em fase reversa em cianopropil como fase estacionária e B: fragmentação do DNMP de massa exata 171,0 g mol⁻¹, íon precursor 172,0 Da, fragmento 126,0 Da, em Da (perda de NO₂), 109,0 Da, em Da (perda de NO₂, CH₃), e 62,0 Da, em Da (perda de NO₂, NO₂, CH₃).



Fonte: Molognoni et al. (2018a).

Figura 2 – Padrão de fragmentação do ácido etilnitroso (ENA) por espectrometria de massas, íon precursor 103,0 Da, fragmento íon nitrito (NO₂⁻) de 46,0 Da; íon fulminato (CNO⁻) de 43,0 Da; e íon etenamida (C₂H₂N⁻) de 41,2 Da.



Fonte: Molognoni et al. (2019).

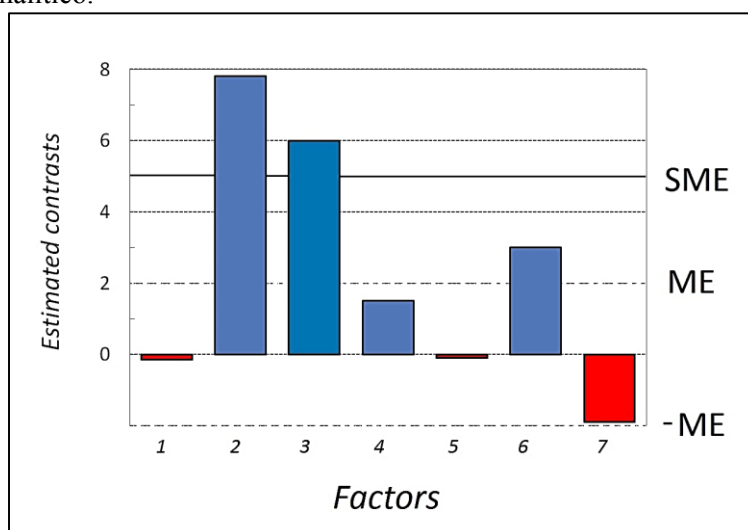
O N-PIP apresentou o precursor em 129,1 Da e um fragmento intenso em 84,0 Da (perda COOH), de maneira semelhante ao relatado por Lijinsky, Keefer e Loo (1979).

A pureza dos compostos foram todos acima de 92%. Apesar do rendimento ser inferior ao relatado na literatura para N-PIP e DNMP, as sínteses foram consideradas adequadas ao propósito.

3.2 Método de extração

Na primeira etapa do desenvolvimento do método de extração, a estimativa dos contrastes provocados pelos efeitos das variáveis produziram efeitos significativos. O solvente de extração, a quantidade de água na solução de extração e a adição de 10 mmol L⁻¹ de acetato de amônio afetaram significativamente a robustez do procedimento analítico ($p < 0,05$), com valores superiores aos ME e SME (Figura 5).

Figura 3– Estimativa dos contrastes das variáveis de extração selecionadas durante o procedimento analítico.



Onde, fatores (1): massa de amostra (1 e 2 g); (2): solvente de extração (metanol e acetonitrila); (3): proporção de aquoso no solvente de extração (10 e 80%), (4): uso de ácido fórmico (< pka ENA) e ácido acético (> pka ENA), (5): clean-up com solvente apolar (hexano e acetato de etila), (6): uso ou não de amônio na reconstituição do extrato seco (acetato de amônio em 10 mM e sem) e (7): proporção de orgânico na reconstituição do extrato seco (MeOH e ACN, em 70%).

Fonte: Molognoni et al. (2019).

A ACN apresentou maior eficiência na extração do ENA e DNMP em relação ao MeOH. Isso também foi relatado em outros estudos que utilizaram ACN para extrair nitro compostos de baixa massa molecular (ex. nitrosaminas) em carnes processadas (HERRMANN; DUEDAHL-OLESEN; GRANBY, 2014). Por outro lado, a proporção de aquoso no solvente de extração demonstrou bons resultados quando estava alta ou baixa, em relação à ACN. Esses resultados levaram o nosso grupo de pesquisa a testar diferentes técnicas de extração que empregam alta (PLE) ou baixa proporção de aquoso (SLE-LTP). O uso de amônio na reconstituição do extrato aumentou a sensibilidade de resposta do ENA. Isso foi de fácil compreensão, uma vez que a utilização de MeOH tamponado em

pH superior ao pKa do ENA, utilizando 10 mM de acetato de amônio e 0,05% ácido acético (pH $4,5 \pm 0,5$) manteve ENA na forma desprotonada. Esse princípio foi utilizado na detecção do ENA por ESI- MS/MS em modo negativo. Já em relação a extração do ENA na matriz, a desprotonação da molécula demonstrou baixo efeito. Entretanto, considerando que a estimativa do contraste foi próximo a ME, esse parâmetro foi revisto com cautela, confirmando melhoras sutis ao utilizar 0,1% de ácido fórmico (ENA na forma protonada).

Os resultados da segunda etapa demonstraram que diferentes técnicas de extração podem ser aplicadas ao ENA e DNMP. Entretanto, de acordo com a figura 6, parte A, SLE-LTP > SPE V > SPE IV > QuEChERS I > QuEChERS II, demonstraram maior capacidade de extração dos analitos ao reproduzir os maiores sinais analíticos (valores médios), respectivamente. Somente SPE II (NH₂) não apresentou potencial de extração, reproduzindo baixos sinais analíticos com incertezas grandes. Isso porque o sinal analítico era da mesma ordem de grandeza que o ruído do sistema (Figura 6, parte A). Isso pode ter ocorrido devido à propriedade do analito ser solúvel tanto em solventes orgânicos quanto em água, eluindo do cartucho durante as lavagens. Em relação aos sorventes em SPE, as melhores respostas foram produzidas por Strata-X e RP-102. Ambas as fases sólidas são materiais poliméricos, que geralmente têm sido empregados para a limpeza de compostos neutros e ácidos, bem como de espécies alcalinas de baixa massa molecular. Provavelmente, o uso de SPE em modo tandem, com um primeiro cartucho de troca iônica para remover os efeitos da matriz e um segundo cartucho com fase polimérica para reter o ENA, seria uma alternativa para o nosso método. No entanto, considerando que os métodos de rotina devem ser tão simples e baratos quanto possível, essa alternativa não foi considerada.

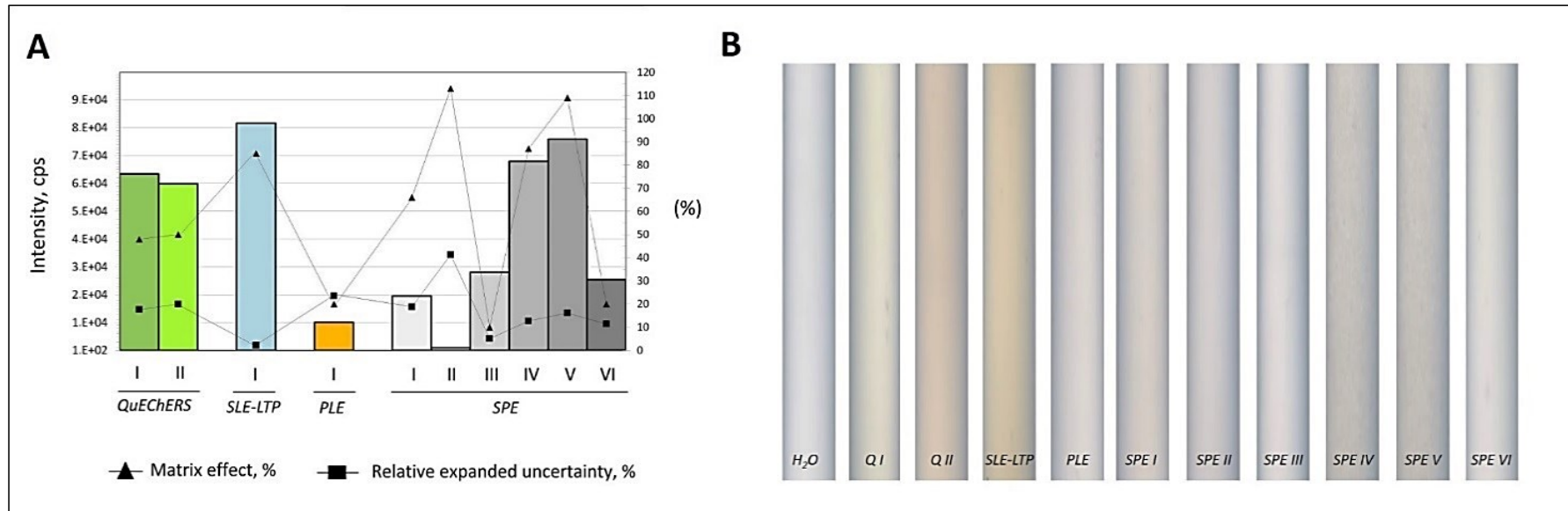
Considerando a capacidade de limpeza do extrato, SPE VI > SPE III > PLE > SPE II tiveram os melhores resultados, respectivamente (Figura 6, parte B). Pode-se fazer uma analogia que a alta seletividade do método para a remoção dos concomitantes da matriz, levou a uma baixa sensibilidade de detecção do ENA, ao remover o analito juntamente com outros constituintes. Por outro lado, os sinais mais elevados foram referentes aos extratos mais sujos, que mantiveram cores e turvações proporcionadas pelos constituintes alimentares não removidos no processo, como mioglobina, hemoglobina, catalase e citocromo-enzimas, entre outros. Por exemplo, o QuEChERS II (sem carvão ativado) e o

SLE-LTP produziram extratos avermelhados, típicos de pigmentos de carne e corantes usados para processamento de carne como o corante carmim de cochonilha e caramelo. (Figura 4, parte B). Entretanto, sinais analíticos elevados mas com elevado efeito de matriz devem ser vista com cautela, pois efeitos sistemáticos não podem ser reduzidos com o aumento do número de medidas e são de difícil controle em análises com diversificada condição matricial como análise de alimentos (MOLOGNONI et al., 2019).

Alcançar o equilíbrio entre a limpidez do extrato, reprodutibilidade e sensibilidade do procedimento de extração é sem dúvidas o maior objetivo a ser alcançado ao desenvolver de um método. O uso do carvão ativado, tanto no emprego do PLE quanto QuEChERS proporcionou uma maior eficiência de clean-up, principalmente na remoção dos pigmentos. Outros pesquisadores já haviam demonstrado a versatilidade do carvão em procedimentos de extração. Kurz et al. (2018), demonstrou que o sorvente foi capaz de realizar o clean-up de pigmentos, como por exemplo, na limpeza de extratos de cenouras ricos em carotenoides. Por outro lado, também foi demonstrado que o carvão pode ser utilizado como o adsorvente de analitos, empregando-o em extrações em fase sólida para concentração da espécie química (ZHAO et al., 2008).

Quando os parâmetros efeitos de matriz na fonte de ionização, variabilidade randômica no sistema LC-MS/MS e a capacidade de limpeza do extrato (acuidade visual) foram avaliados (Figura 6), QuEChERS I e PLE foram selecionados para segunda etapa do desenvolvimento. Por outro lado, devido à alta sensibilidade de resposta e a baixa variabilidade randômica, SLE-LTP também foi selecionado mesmo com o elevado efeito de matriz. Apesar de no geral métodos SPE apresentarem bons resultados, nenhum deles foi selecionado. Essa decisão levou em consideração que não apresentaram grande superioridade em relação outras técnicas testadas, e são reconhecidamente mais custosas para laboratórios de países importadores dos insumos. Por fim, não foram identificadas reações de nitrosação durante as condições experimentais do procedimento extrativo.

Figura 4– Resultados da segunda etapa de avaliação das técnicas de extração, com base na incerteza de medição, efeito de matriz, intensidade do sinal analítico e limpeza do extrato final com base em valores médios.



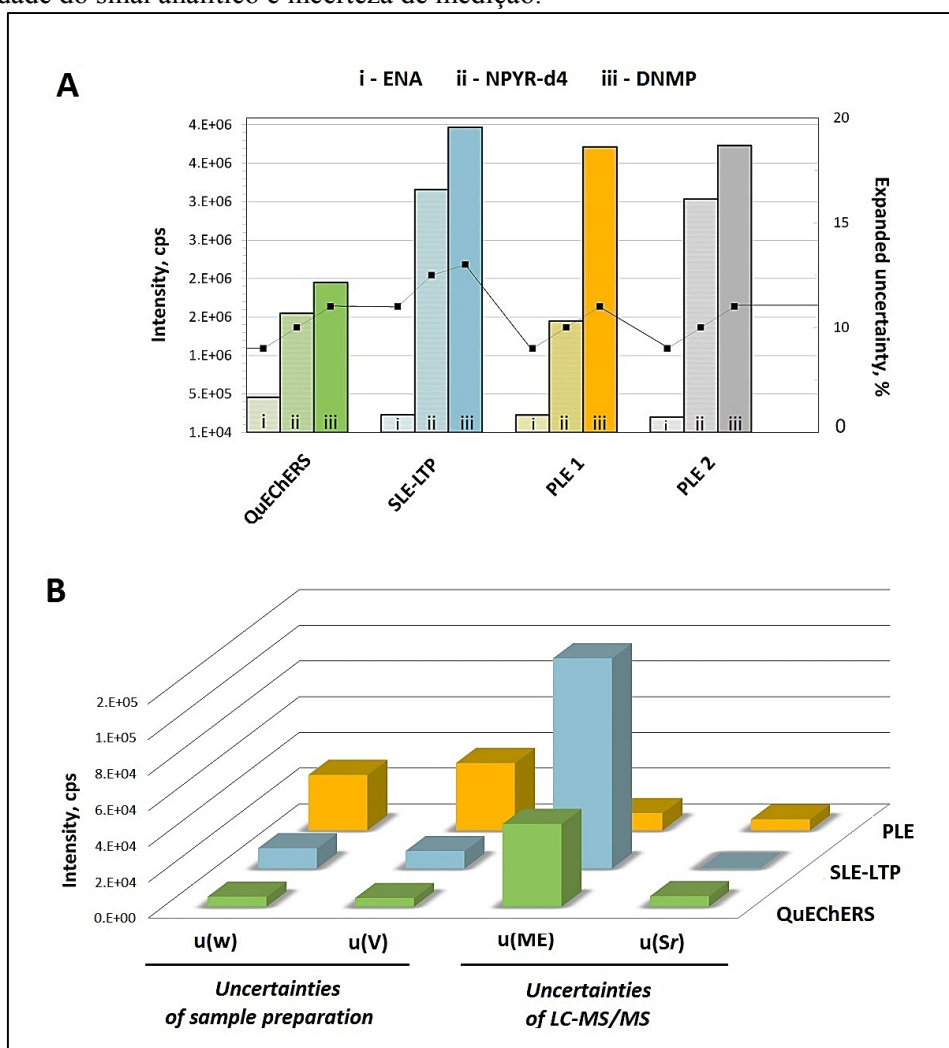
QuEChERS = Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe, SLE-LTP = extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura, PLE = extração por líquido pressurizado, SPE = extração por fase sólida, QuEChERS I = QI, QuEChERS II = QII, SPE I = CN; SPE II = NH₂, SPE III = SB, SPE IV = Strata-X, SPE V = RP-102, and SPE VI = SiOH.

Fonte: Molognoni et al. (2019).

Ao final, a otimização do PLE empregando carvão ativado e terra diatomácea demonstrou ser a melhor abordagem em relação a QuEChERS I e SLE-LTP, uma vez que produziu extratos totalmente límpidos (baixo efeito de matriz) e alta sensibilidade de resposta para todos os mensurandos (Figura 7, parte A). Ao considerar o valor global da incerteza de medição, QuEChERS I e PLE obtiveram resultados próximos, com valor maior para PLE. Ao contrário, SLE-LTP apresentou elevadas fontes de incertezas sistemáticas, devido ao ganho de sinal na fonte ESI ocasionada pela matriz, já que o método apresenta baixa seletividade para extração dos concomitantes.

Por outro lado, o estudo das incertezas revelou diferentes perfis para QuEChERS e PLE, de acordo com o princípio e o procedimento analítico submetido. PLE apresentou maiores fontes de incertezas relacionadas ao preparo da amostra, devido à propagação de incertezas relacionadas a procedimentos volumétricos extensos com instrumentos de baixa legibilidade e precisão (cafeteira). Além disso, por aplicar temperatura elevada (± 70 °C) no princípio extrativo, flutuações de temperatura e viscosidade dos fluidos propagaram incertezas relacionadas à massa e o volume do extrato final (Figura 7, parte B). Em relação às incertezas sistemáticas, ambas apresentaram valores abaixo de 20%. Isso foi devido ao potencial dos métodos em remover a matriz dos extratos. Por outro lado, QuEChERS I apresentou maior fonte de incerteza sistemática, que pode estar relacionada aos reagentes empregados, uma vez que também apresentou extratos límpidos. Mas por ser tratar de um método rápido e prático, com procedimentos analíticos reduzidos, as incertezas no preparo foram as menores em relação a todos os outros métodos (Figura 7, parte B). Por fim, o efeito randômico no LC-MS/MS foram baixos e semelhantes para QuEChERS e PLE (inferiores a 10%). SLP-LTP obteve os menores efeitos (inferiores a 5%). Entretanto, o sinal analítico elevado na resposta, ocasionada por incertezas sistemáticas, subestimou essa avaliação.

Figura 5– Resultados da etapa final (otimização) das técnicas de extração, com base na intensidade do sinal analítico e incerteza de medição.



u(w): incerteza padrão combinada referente a procedimento de pesagem; u(V): incerteza padrão combinada referente a procedimentos volumétricos; u(ME): incerteza padrão referente aos efeitos sistemáticos na fonte de ionização ESI; u(Sr): incerteza padrão referente aos efeitos aleatórios no sistema LC-MS/MS.

Fonte: Molognoni et al. (2019).

3.3 Abordagens de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A análise quantitativa de moléculas pequenas por LC-MS/MS representa um desafio analítico, uma vez que pode conferir sinal ruído intenso, baixa sensibilidade e reprodutibilidade de fragmentação dos íons e baixa retenção em fases estacionárias. Entretanto, nas últimas décadas o aperfeiçoamento das técnicas de ionização, separação cromatográfica e espectrômetro de massas proporcionam condições fundamentais para o desenvolvimento de métodos sensíveis e alta confiabilidade, tornando possível analisar

em μg moléculas abaixo de 100 Da. (TILLER; ROMANYSHYN; NEUE, 2003; WANG; GIESE, 2017).

A otimização dos parâmetros de fonte ESI e dos quadrupolos proporcionaram sensibilidade e resolução adequada para análise do ENA e DNMP. A otimização MRM em modo positivo não obteve bons resultados para o ENA. Por outro lado, em modo negativo o precursor 103,0 Da (Figura 4) obteve alta sensibilidade de resposta e proporcionou produtos de quebra hemolítica adequadas para identificação e quantificação do composto por MS/MS (Figura 4). O fragmento mais intenso foi proporcionado pelo ânion NO_2^- com 46 Da, sendo utilizado para a quantificação do ENA. O segundo fragmento mais intenso foi o ânion CNO^- com 42 Da. Esse fragmento foi utilizado para identificar o composto nas matrizes de estudo através da razão iônica (Figura 4). Os dois fragmentos apresentaram boa sensibilidade e resolução de resposta nos quadrupolos, atingindo razões superiores a 15%. A desprotonação da molécula foi fundamental para atingir esses resultados. O uso de 70% de MeOH, 10 mM de acetato de amônio e 0,05% ácido acético demonstrou ser a melhor condição otimizada. Por outro lado, o DNMP apresentou melhores resultados em modo positivo, com o precursor 172 Da e produtos de fragmentação como os íons 126 Da (perda de NO_2), 109 Da (perda de NO_2 , CH_3) e 62 Da (perda de NO_2 , NO_2 , e CH_3) (figura 3, parte B). Esses foram achados razoáveis, uma vez que a perda dos grupos nitro e metil do anel pirrol já eram esperadas.

Na escolha do padrão interno de estrutura similar o 3,5-DNB, I-MEI o NPYR-d4 demonstraram bons resultados, uma vez que não apresentaram interferentes isobáricos, obtiveram boa ionização e características físico-químicas similares durante a retenção em fases estacionárias. O melhor resultado em modo negativo foi para o 3,5- DNB, ao utilizar o precursor 210 Da e produto de quebra de 166 Da (perda de NO_2), com retenção de 4,5 minutos em fase reversa-C18 e para NPYR-d4 com o precursor 105 Da e fragmento 59 Da (perda de C_3H_5), com retenção 3.3 min em fase reversa-C18. Apesar do 3,5 DNB apresentar um produto de fragmentação similar (NO_2^-) ao ENA, o padrão interno não simulou os analitos nos procedimentos de extração. Dessa forma, o NPYR-d4 foi escolhido como o padrão interno, uma vez que melhor simulou o analito durante todo o procedimento analítico, e apresenta propriedades físico-químicas semelhantes. O I-MEI somente apresentou características semelhantes ao DNMP, conforme proposto por Molognoni et al. (2018b).

Tabela 2– Parâmetros otimizados no espectrômetro de massas.

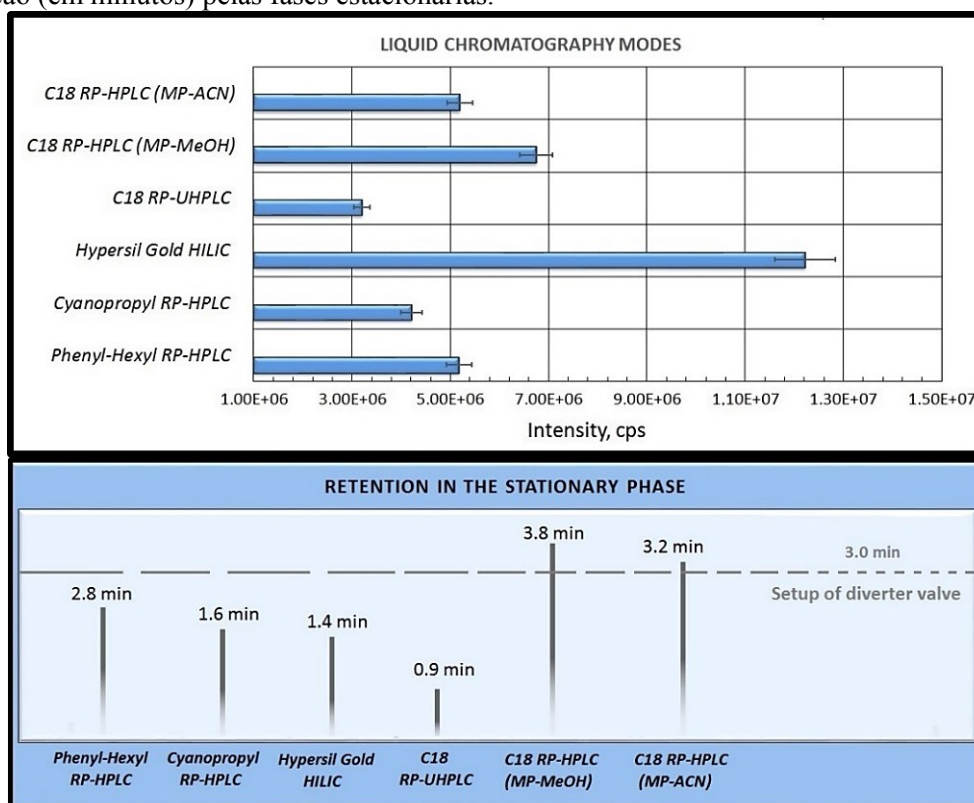
Composto	Fórmula molecular	Íon precursor (Da, m/z)	Produtos de quebra (Da, m/z)	DP (V)	EC (V)
2-metil-1,4-dinitro pirrol	C ₅ H ₅ N ₃	171,9	125,1 (Q); 67,0 (I); 109,0 (I)	61	17
1-metil imidazol	C ₄ H ₆ N ₂	83,0	56,0 (Q)	25	10
Ácido DL-pipicólico	C ₆ H ₁₁ NO ₂	1300	66,9 (Q), 64,8 (I)	71	35
<i>N</i> -nitroso ácido DL-pipicólico	C ₆ H ₁₀ N	159,1	84,0 (Q) 128,0 (I)	56 56	21 10
Ácido etilnitroso	C ₂ H ₄ N ₂ O ₃	102,9	46,1 (Q); 42,0 (I); 41,2 (I)	-50	-50
<i>N</i> -nitrosopirrolidina-d4	C ₄ H ₄ D ₄ N ₂ O	105,1	59,2 (Q)	86	50
Cloreto de 3,5-dinitro benzeno	C ₇ H ₃ ClN ₂ O ₅	210,9	166,9 (Q)	-45	-14

EC: energia de colisão; DP: Potencial aplicado no capilar; Q: íon para quantificação; I: íon para identificação.

Fonte: Molognoni et al. (2019).

De acordo com as figuras 8 e 9, diversas abordagens de cromatografia líquida foram efetivas na separação dos analitos. Somente foi apresentado resultados em relação ao ENA, uma vez que era o analito de maior dificuldade em análises por cromatografia líquida. Entretanto, algumas apresentaram melhores performances de intensidade de sinal, retenção e reprodutibilidade analítica. Em modo HILIC, foi obtido o maior sinal analítico, mas a baixa retenção do analito e um maior tempo de equilíbrio para restabelecer o equilíbrio químico da fase foram decisivos na avaliação negativa (maiores desvios de repetitividade).

Figura 6– Parâmetros de diferentes modos de cromatografia líquida para a análise do ácido nítrico etílico (ENA): intensidade máxima do sinal (em cps), variabilidade aleatória e tempo de retenção (em minutos) pelas fases estacionárias.



Fonte: Molognoni et al. (2019).

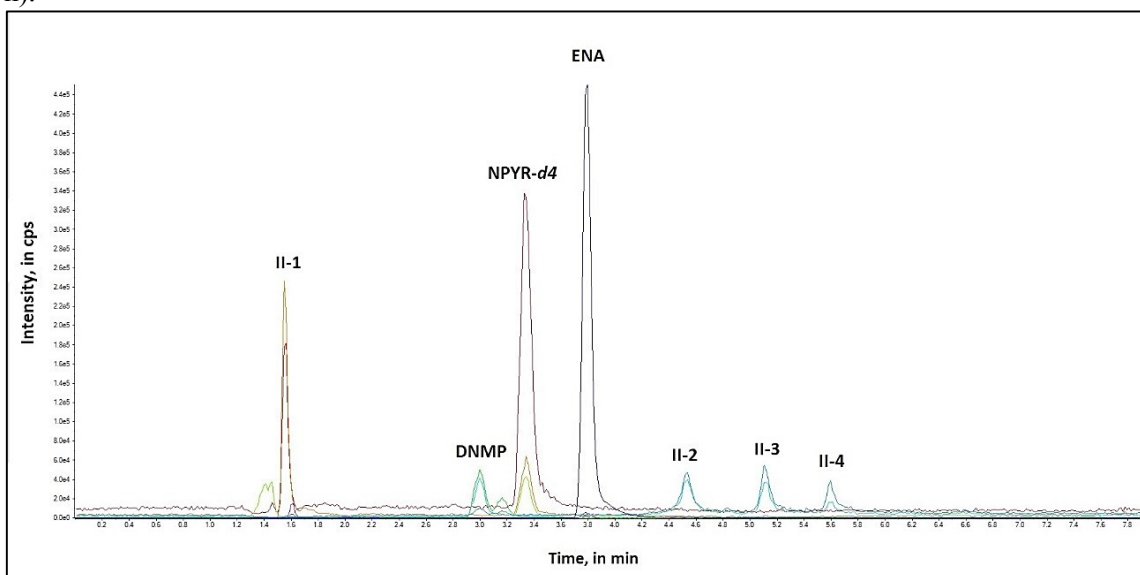
A cromatografia líquida em fase reversa demonstrou melhores resultados em relação à HILIC, com maiores retenções em C18 > fenil-hexil > cianopropil, respectivamente. Proporcionalmente, ao empregar ultra eficiência em C18, os resultados não foram considerados superiores ao modo HPLC. Encurtar o tempo total de corrida em 7 min não apresentou vantagens em relação ao uso da válvula de desvio. Os picos cromatográficos não apresentaram melhor resolução. Dessa forma, C18 em alta eficiência foi adotada como o método cromatográfico, ao demonstrar o segundo maior sinal analítico e baixa variabilidade empregando MeOH como solvente de eluição (figura 8).

3.4 Validação analítica

Espécies químicas de baixas massas molares são suscetíveis a transições interferentes em análises por LC-MS, como as provenientes de matrizes complexas como carnes processadas. Apesar disso, a seletividade do método foi comprovada. A resolução cromatográfica foi satisfatória sem co-eluição dos interferentes isobáricos (II-1, II-2, II-3

e II-4) (Figura 9). Além disso, o pico interferente II-1 pode ser desconsiderado para a análise de rotina, devido ao uso da válvula de descarga durante os primeiros três minutos de cada corrida (Figura 8). Os outros interferentes produziram um sinal analítico constante quando submetidos a um gradiente de concentração dos analitos durante o processo de fortificação. Esta avaliação também foi eficaz para a análise de drogas veterinárias em outros estudos cromatográficos com matrizes complexas, tais como alimentos para animais (MOLOGNONI et al., 2018c). Além disso, os fragmentos interferentes não tinham o mesmo íon precursor dos analitos. Finalmente, os ensaios com fase móvel apenas demonstraram que todas as transições não eram suscetíveis à contaminação cruzada, adotando um tempo de auto-equilíbrio do sistema de 4 min.

Figura 7– Cromatograma dos analitos ácido etilnitrólico (ENA), 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP), do padrão interno N-nitrosopirrolidina-d4 (NPYR-d4) e dos interferentes isobáricos (II-n).



Fonte: Molognoni et al. (2019).

O método desenvolvido foi linear nas faixas de concentração consideradas para este estudo (Tabela 3). Todos os coeficientes de regressão foram satisfatórios com valores de $R^2 \geq 0,98$. Precisão e recuperação do método também foram aceitáveis, produzindo valores de CV menores que 20% e taxas de recuperação entre 77 e 92%.

A capacidade de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade de detecção ($CC\beta$) são parâmetros definidos pela Decisão 2002/657/CE da Comissão para avaliar o desempenho do procedimento analítico e para interpretar os seus resultados nos níveis de interesse 21. Embora estas incertezas não possam ser considerado para toda a faixa analítica, são

essenciais para a tomada de decisão quando existem limites estabelecidos ($CC\alpha$), ou no caso de decisões sobre resultados positivos ($CC\beta$). O erro α foi entre 3 e 16% e o erro β foi entre 5 e 25% para ENA e DNMP, respectivamente. Estes valores foram considerados aceitáveis, considerando a legibilidade das medidas e faixas analíticas.

Tabela 3– Parâmetros dos critérios de desempenho do método.

	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Repe (CV%)	Repro (CV%)	R^2	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
ENA	5,00	85,1	12,5	17,3	0,99	5,842	6,263
	10,0	84,0	7,5	13,1			
	15,0	91,8	6,6	11,6			
DNMP	20,0	86,6	6,8	10,5	0,99	20,68	21,02
	40,0	77,3	7,0	10,8			
	60,0	83,2	4,8	8,6			

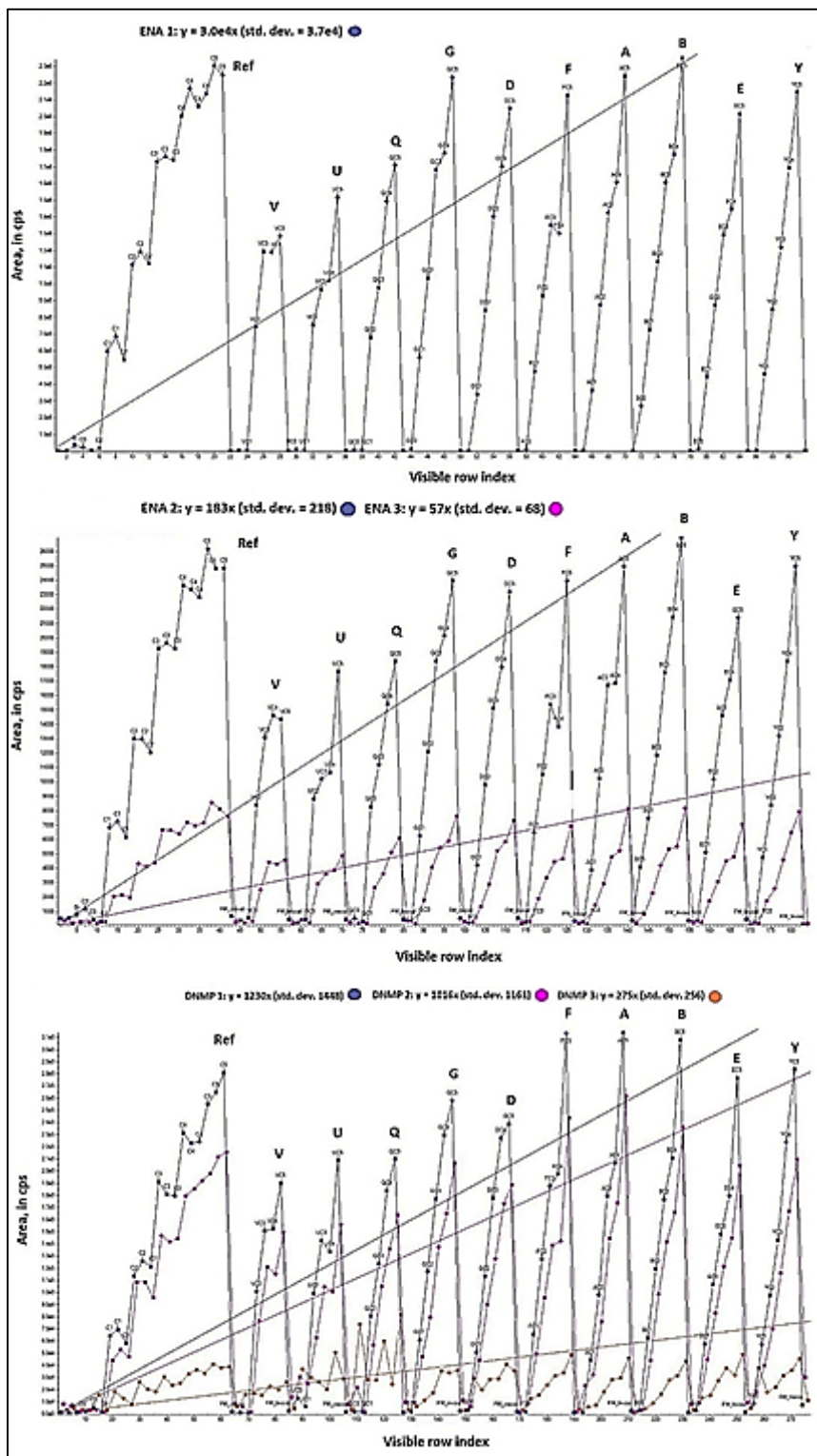
Repe: repetitividade, Repro: reprodutibilidade, CV: coeficiente de variação, $CC\alpha$: capacidade de decisão e $CC\beta$: capacidade de detecção.

Fonte: Molognoni et al. (2019).

3.5 Aplicabilidade do método

Quando o método foi submetido a diferentes amostras comerciais de carnes processadas, um desempenho satisfatório foi alcançado pelo método desenvolvido. Tanto a precisão quanto a recuperação foram aceitáveis, uma vez que a variabilidade foi inferiores a 22% e as taxas de recuperação entre 70 e 110%. Como mostrado na figura 8, ao comparar a calibração adotada usando mortadela branca, o efeito matriz na fonte de ionização produziu diferentes perfis, variando com os produtos cárneos analisados por adição padrão. No entanto, foram observadas diferenças significativas entre os resultados de ENA e DNMP para as matrizes V (peperoni), U (salame 1) e Q (salame 2), quando as duas abordagens de calibração foram consideradas (Figura 10). Para DNMP, diferenças significativas ($P < 0,05\%$) também foram observadas nos resultados da amostra D (hambúrguer). Assim, não é possível usar um único tipo de amostra para representar todas as matrizes deste estudo. Amostras submetidas à proteólise microbiana (devido à fermentação da carne) e formulações com temperos, como salames, peperoni e hambúrguer, apresentaram diferentes perfis no procedimento analítico.

Figura 8– Comparação dos modelos de calibração (em matriz branca e por adição de padrão) realizados para a quantificação do ácido etilnitróico (ENA) e do 2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP) com as amostras de mortadela branca (Ref) produzidas in house, peperoni (V), salame 1 (U), salame 2 (Q), presunto cozido (G), hambúrguer (D), nuggets de frango (F), mortadela de frango (A), salsicha (B), calabresa (E) e patê cárneo (Y). Íons de fragmentação: ENA 1 = 46,0 Da, ENA 2 = 43,0 Da, ENA 3 = 41,0 Da, DNMP 1 = 126,0 Da, DNMP 2 = 110,0 Da, DNMP 3 = 126,0 Da.



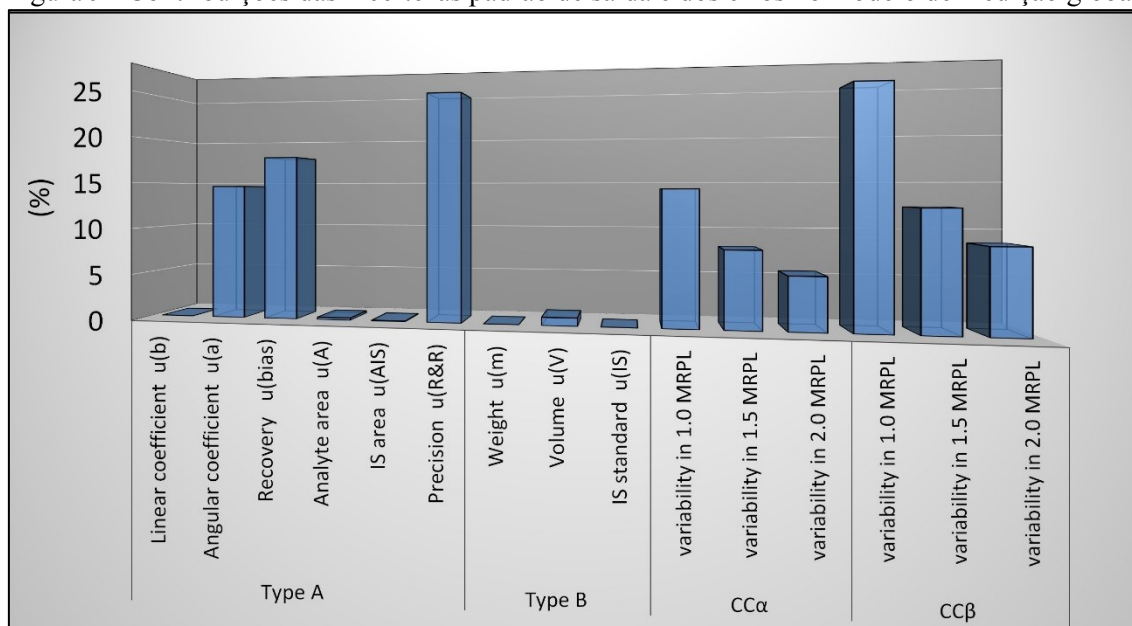
Fonte: Molognoni et al. (2019).

3.6 Erros e incertezas do método

Os resultados das incertezas padrão de saída $u(y_i)$ e os erros analíticos (α e β) são apresentados na figura 11. A maior fonte (24%) de incerteza obtida experimentalmente foi relacionada à precisão em termos de reprodutibilidade interna $u(R\&R)$. A incerteza devido à recuperação $u(\text{bias})$ foi a segunda maior fonte de incerteza com 18%. Embora os coeficientes de variação e as taxas de recuperações tenham sido satisfatórias, a variabilidade dos parâmetros foi responsável por incertezas aleatórias expressivas. A incerteza padrão devido à inclinação das curvas analíticas $u(a)$ também demonstrou contribuição de 15% na incerteza global. Isso foi devido à reprodutibilidade das curvas analíticas matriciais. Entre as incertezas dos sinais analíticos, a área de analito $u(A_{\text{analito}})$ representou 0,2% das contribuições de incerteza, contra apenas 0,07% devido do padrão interno $u(A_{\text{PI}})$. Isto deu-se à menor pureza do DNMP em relação ao padrão interno comercial com 98% de pureza, que são consideradas pela modelagem matemática como incertezas provenientes da impureza. No entanto, ambas as fontes foram insignificantes em relação às outras incertezas. Por outro lado, as incertezas herdadas foram insignificantes em relação às incertezas advindas de erros experimentais. A maior contribuição (0,8%) foi relacionada ao volume de diluição do extrato $u(V)$, que combina incertezas, erros e dados de desempenho herdados de instrumentos volumétricos. No entanto, como mostrado neste estudo, as incertezas obtidas experimentalmente parecem ser um bom estimador da incerteza global, uma vez que as incertezas herdadas parecem ser insignificantes ao serem comparadas às incertezas provenientes de equipamentos e analistas (MOLOGNONI et al., 2019).

O erro β foi utilizado com sucesso para aumentar a confiabilidade dos resultados positivos. Amostras que apresentaram resultados acima de seus respectivos valores de $CC\beta$ foram consideradas positivas. Os valores em% dos erros foram semelhantes às fontes de incertezas $u(R\&R)$, $u(\text{bias})$ e $u(b)$, uma vez que os mesmos dados são considerados para o cálculo. Por outro lado, os erros consideram um maior coeficiente de abrangência em relação à incerteza expandida, uma vez que decisões devem ser tomadas em concentrações do mensurando onde uma incerteza maior é propagada. Isto é demonstrado pela figura 11, onde as fontes de erros aleatórios aumentam com a diminuição da concentração do mensurando considerando um número limitado de medidas. Finalmente, a incerteza padrão expandida foi de 33%.

Figura 9– Contribuições das incertezas padrão de saída e dos erros no modelo de medição global



Erros α e β : obtidos pela adição dos analitos em 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o limite mínimo de desempenho requerido (MRPL) em $\mu\text{g kg}^{-1}$. Todas as incertezas foram calculadas com valores médios do mensurando em $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ e expressos em incerteza padrão expandida relativa ($U\%$) com uma probabilidade de 95% de acerto ($k = 2,00$). Tipo A - Método de avaliação da incerteza pela análise estatística de séries de observações; Tipo B - Método de avaliação da incerteza por outros meios que não a análise estatística de séries de observação.

Fonte: Molognoni et al. (2019).

3.7 Resultados das amostras

Das 70 amostras analisadas dos diferentes produtos cárneos, 29 amostras continham os três conservantes NIT, NAT e SOR. Em cinco delas, com valores acima do máximo permitido para nitrito de 150 mg kg^{-1} (BRASIL, 2006). Além disso, 18 amostras estavam com a adição irregular de sorbato, uma vez que este conservante é proibido em categorias de embutidos cárneos cozidos como salsichas, calabresas, mortadelas, entre outras. Amostras de bacon e salsicha produziram as maiores concentrações de DNMP com 68 ± 3 e $50 \pm 3 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Duas amostras apresentaram resultados positivos para o ENA em patê de frango e mortadela, com valores superiores ao $CC\beta$ ($6,263 \mu\text{g kg}^{-1}$, $k = 3,00$). A amostra de referência de mortadela utilizada para o desenvolvimento do procedimento de extração produziu resultados de $17 \pm 3 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $48,9 \pm 8 \mu\text{g kg}^{-1}$ de ENA e DNMP, respectivamente. Em resumo, 8 amostras das 70 analisadas apresentaram resultados positivos de ENA e DNMP.

4 CONCLUSÃO

Os compostos mutagênicos ENA e DNMP foram sintetizados e caracterizados com sucesso, permitindo o desenvolvimento e validação do método analítico. O melhor procedimento de extração foi o d-SPE, devido à sua praticidade e bom desempenho para a análise de ENA e DNMP em produtos cárneos. A validação do método gerou resultados satisfatórios, considerando os critérios de desempenho e aplicabilidade, permitindo a quantificação em $\mu\text{g kg}^{-1}$ de espécies químicas em amostras complexas. A inovação química produziu resultados de extrema importância que podem auxiliar em futuros estudos relacionados à formação de compostos carcinogênicos em função do processamento de carnes e do uso de aditivos. Compreender a formação desses carcinogênicos com o auxílio de ferramentas analíticas de alta confiabilidade metrológica pode apoiar melhor a avaliação de risco para o aumento da incidência de cânceres relacionados a fatores ambientais como a dieta.

REFERÊNCIAS

- ARMENTA, S.; DE LA GUARDIA, M.; ESTEVE-TURRILLAS, F. Hard Cap Espresso Machines in Analytical Chemistry: What Else?. *Analytical Chemistry*, v. 88, n. 12, p. 6570-6576, 2016.
- BINSTOK, G. et al. Sorbate–nitrite reactions in meat products. *Food Research International*, v. 31, n. 8, p. 581-585, 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 51, de 29 de dezembro de 2006. Regulamento técnico de atribuição de aditivos, Brasília: Diário Oficial da União (Seção 1),
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 272, de 14 de março de 2019. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Brasília: Diário Oficial da União (Seção 1), ed. 52, p. 194.
- DELLA BETTA, F. et al. A sub-minute CZE method to determine nitrate and nitrite in meat products: An alternative for routine analysis. *Meat Science*, v. 119, p. 62-68, 2016.
- DROSINOS, E. et al. Inhibitory effect of organic acid salts on spoilage flora in culture medium and cured cooked meat products under commercial manufacturing conditions. *Meat Science*, v. 73, n. 1, p. 75-81, 2006.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives. *EFSA Journal* v. 13, n. 6, 2015.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 2002/657/EC of 12 AUGUST 2002: Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. Brussels, L221/8, 2002: *Off. J. Of the Eur. Communities*, 2002.
- HANSEN, T.; TANNENBAUM, S.; ARCHER, M. Identification of nonenylnitrolic acid in corn treated with nitrous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 29, n. 5, p. 1008-1011, 1981.
- HERRMANN, S.; DUEDAHL-OLESEN, L.; GRANBY, K. Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation. *Journal of Chromatography A*, v. 1330, p. 20-29, 2014.
- HOFF, R. et al. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. *Talanta*, v. 132, p. 443-450, 2015.

- KADA, T. DNA-damaging products from reaction between sodium nitrite and sorbic acid. *Annu. Rep. Nat. Inst. Genet.*, 1974.v. 24, p. 43-44, 1974.
- KITO, Y.; NAMIKI, M.; TSUJI, K. A new n-nitropyrrole. *Tetrahedron*, v. 34, n. 5, p. 505-508, 1978.
- KURZ, M. et al. Clean-up Procedure Development and Method Validation for Pesticide Residues Analysis in Carrots. *Food Analytical Methods*, v. 12, n. 1, p. 282-292, 2018.
- LENTH, R. Quick and Easy Analysis of Unreplicated Factorials. *Technometrics*, v. 31, n. 4, p. 469, 1989.
- LIJINSKY, W.; KEEFER, L.; LOO, J. The preparation and properties of some nitrosamino acids. *Tetrahedron*, v. 26, n. 21, p. 5137-5153, 1970.
- MOLOGNONI, L. et al. A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. *Talanta*, v. 178, p. 1053-1066, 2018a.
- MOLOGNONI, L. et al. Development of a new analytical tool for assessing the mutagen 2-methyl-1,4-dinitro pyrrole in meat products by LC-ESI-MS/MS. *Talanta*, v. 185, p. 151-159, 2018b.
- MOLOGNONI, L. et al. Influence of method validation parameters in the measurement uncertainty estimation by experimental approaches in food preservatives analysis. *Food Chemistry*, v. 282, p. 147-152, 2019.
- MOLOGNONI, L. et al. Simultaneous analysis of spectinomycin, halquinol, zilpaterol, and melamine in feedingstuffs by ion-pair liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1569, p. 110-117, 2018c.
- MUKHERJEE, A. et al. Sister chromatid exchanges and micronuclei formations induced by sorbic acid and sorbic acid-nitrite in vivo in mice. *Toxicology Letters*, v. 42, n. 1, p. 47-53, 1988.
- NAMIKI, M. et al. Formation of mutagens by sorbic acid-nitrite reaction: effects of reaction conditions on biological activities. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 73, n. 1, p. 21-28, 1980.
- OSAWA, T.; NAMIKI, M. Mutagen Formation in the Reaction of Nitrite with the Food Components Analogous to Sorbic Acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 46, n. 9, p. 2299-2304, 1982.
- OSAWA, T. et al. Desmutagenic action of food components on mutagens formed by the sorbic acid/nitrite reaction. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 50, n. 8, p. 1971-1977, 1986.

PÉREZ-PRIOR, M. et al. Reactivity of Some Products Formed by the Reaction of Sorbic Acid with Sodium Nitrite: Decomposition of 1,4-Dinitro-2-methylpyrrole and Ethylnitrolic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 24, p. 11824-11829, 2008.

PÉREZ-PRIOR, M. et al. Reactivity of the Mutagen 1,4-Dinitro-2-methylpyrrole as an Alkylating Agent. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 75, n. 5, p. 1444-1449, 2010.

ROBACH, M.; SOFOS, J. Use of Sorbates in Meat Products, Fresh Poultry and Poultry Products: A Review. *Journal of Food Protection*, v. 45, n. 4, p. 374-383, 1982.

ROBACH, M.; STATELER, C. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Potassium Sorbate in Combination with Sodium Chloride, Tertiary Butylhydroquinone, Butylated Hydroxyanisole or Ethylenediamine Tetraacetic Acid. *Journal of Food Protection*, v. 43, n. 3, p. 208-211, 1980.

SOFOS, J. Improved Cooking Yields of Meat Batters Formulated with Potassium Sorbate and Reduced Levels of NaCl. *Journal of Food Science*, v. 50, n. 6, p. 1571-1575, 1985.

TILLER, P.; ROMANYSHYN, L.; NEUE, U. Fast LC/MS in the analysis of small molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 377, n. 5, p. 788-802, 2003.

WANG, P.; GIESE, R. Recommendations for quantitative analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1486, p. 35-41, 2017.

ZHAO, R. et al. Investigation of feasibility of bamboo charcoal as solid-phase extraction adsorbent for the enrichment and determination of four phthalate esters in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1183, n. 1-2, p. 15-20, 2008.

**CAPÍTULO IV - BIOTRANSFORMAÇÃO MICROBIANA DE COMPOSTOS
MUTAGÊNICOS TIPO N-NITRO, C-NITRO E C-NITROSO EM PRODUTOS
CÁRNEOS POR *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SUBSP. *BULGARICUS***

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Ao longo deste projeto de tese de doutorado foram desenvolvidas e/ou reproduzidas da literatura diferentes abordagens de síntese orgânica, quantificação de espécies químicas, modelos estatísticos descritivos e processamento tecnológico de carnes visando a concretização deste capítulo. Dessa forma, o capítulo IV descreve o estado da arte desta tese, representando a principal problemática e uma proposta para a remediação do problema. Nesse caso, o efeito desmutagênico provido por bactérias ácido láctica (*L. bulgaricus*) através de um tratamento desenvolvido pós processamento (processo fermentativo) sobre o ácido etilnitroso (ENA) e 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP) foi investigado.

Pela primeira vez na literatura são demonstrados detalhes sobre a formação e degradação do ENA e DNMP em condições reais de processamento de carnes. Esse estudo foi publicado no periódico *Food and Chemical Toxicology*.

Artigo publicado:

MOLOGNONI, L. et al. Microbial biotransformation of *N*-nitro-, *C*-nitro-, and *C*-nitrous-type mutagens by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in meat products. *Food and Chemical Toxicology*, 110964, 2019. Doi:10.1016/j.fct.2019.110964.

RESUMO

Recentemente, as carnes processadas foram classificadas como cancerígenas para os seres humanos. No entanto, ainda faltam informações sobre os agentes responsáveis e a influência do processamento industrial no aumento do risco de câncer. Este estudo teve como objetivo utilizar culturas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB-UFSC 01 para biodegradar compostos nocivos tipo C-nitrosos, N-nitro e C-nitro presentes em matriz cárnea processada. Primeiramente, resultados positivos para o ácido etilnitroso (ENA) ($> 5,00 \mu\text{g kg}^{-1}$) e 2-metil-1,4-dinitropirrol (DNMP) ($> 12,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) foram obtidos em mortadelas produzidas sob diferentes condições experimentais empregando conservantes e antioxidantes. Mortadelas contendo proporção de 8:1 (m/m) de nitrito e sorbato, respectivamente forneceram as maiores concentrações. No entanto, o tratamento desenvolvido empregando culturas LB-UFSC 01, foi capaz de modular os compostos nocivos presentes na mortadela. Vários métodos LC-MS e modelos estatísticos foram empregados na identificação dos metabólitos e rotas reacionais durante a biotransformação microbiana. Pela primeira vez, um estudo apresentou informações relevantes a respeito da formação e degradação do ENA e DNMP em modelo cárneo processado simulando condições reais.

Palavras-chave: Câncer. 2-metil-1,4-dinitro pirrol. Ácido etilnitroso. Conservantes de alimentos. Controle de alimentos. Cultura microbiana *starter*.

ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease feared by the world population. Recently, processed meats have been classified as carcinogenic to humans. However, information about the responsible agents and the influence of industrial processing on the increased risk of cancer is still lacking. In this study, fermentative processes were able to biodegrade the ethyl nitrolic acid (ENA) and the 2-methyl-1,4-dinitropyrrole (DNMP), mutagenic compounds produced by reactions between preservatives in thermally processed meat products. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB-UFSC 001 used nitroreductase and NHase enzymes to eliminate the potential mutagenic capacity of the compounds. For the first time, a study on the formation and biodegradation of ENA and DNMP under real meat processing conditions was reported. New research into carcinogens in processed meats may help scientists better understand the risk ratings attributed to the consumption of these foodstuffs. The main uncertainties of the study were raised for clarity of information.

Keywords: Carcinogênese. 2-methyl-1,4-dinitropyrrol. Ethylnitrolic acid. Food preservatives. Food safety. Microbial starters.

1 INTRODUÇÃO

A fermentação promove alterações sensoriais, reações bioquímicas e bacteriológicas que resultam em melhorias do sabor e aceitação comercial dos produtos cárneos. Há séculos é uma forma reconhecida de evitar a multiplicação de microorganismos em alimentos, mesmo sem o emprego de conservantes. Culturas iniciadoras (*starters*), como as bactérias ácido lácticas (BAL), são usadas para viabilizar a fermentação controlada através do inócuo direto a massa cárnea e conferir ao produto características peculiares de singularidade e qualidade (DE DEA LINDNER, 2017). *Lactobacillus bulgaricus*, demonstra grandes feitos tecnológicos na produção de alimentos e efeitos nutracêuticos. A prevenção de doenças inflamatórias do intestino através dos efeitos probióticos do *Lactobacillus bulgaricus* foram comprovados (NAGAI et al., 2011; BASSAGANYA-RIERA et al., 2012; KANO et al., 2013).

Por outro lado, o conservante nitrito na forma de sais à base de sódio (NaNO_2) ou potássio (KNO_2) atua como um aditivo alimentar multifuncional em carnes processadas, atribuindo características sensoriais específicas, retardando reações catalíticas, e conferindo propriedades antimicrobianas (WÓJCIAK; KARWOWSKA; DOLATOWSKI, 2014; FENG et al., 2016). No entanto, o emprego do nitrito no processamento de carnes tem sido relacionado, sob determinadas condições, à formação de compostos nocivos à saúde humana. A formação de compostos carcinogênicos do tipo *N*-nitroso (nitrosaminas) está entre os mais citados (HERRMANN et al., 2015, HERRMANN; GRANBY; DUEDAHL-OLESEN, 2015; HERRAIZ; GALISTEO, 2018). Dessa forma, visando manter as características marcantes do nitrito em carnes curadas e reduzir seu potencial nitrosante, o uso em menores concentrações aliado a outros conservantes foi estudado no passado. Quando o nitrito de sódio foi utilizado junto ao sorbato de potássio, a vida de prateleira dos produtos cárneos aumentou, bem como a capacidade de inibição ao *Clostridium botulinum* (SOFOS; BUSTA; ALLEN, 1979; SOFOS, 1985; ZAMORA; ZARITZKY, 1987). Entretanto, a interação entre os conservantes gerou compostos do tipo *N*-nitro, *C*-nitro e *C*-nitroso. De fato, evidências da formação do ácido etilnitrólico (ENA) e do 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP), com propriedades mutagênicas em testes bacterianos, foram reveladas (KITO; NAMIKI; TSUJI, 1978; NAMIKI et al., 1980; PÉREZ-PRIOR et al., 2009).

O câncer é uma das doenças mais temidas pela população mundial. De fato, após as doenças cardiovasculares, é a principal causa de morte humana na atualidade. Por envolver fatores genéticos e ambientais, tem sido considerado uma doença multifatorial. Foi demonstrado, através de meta análise que o consumo regular de produtos cárneos aumenta o risco de exposição a compostos com potencial carcinógeno (IARC, 2015). No entanto, existem poucos estudos a respeito dos compostos tóxicos formados na interação entre conservantes e processamento de carnes. Pouco se sabe a respeito da formação do ENA e DNMP em condições reais do processamento de carnes (EFSA, 2015).

Os últimos estudos disponíveis demonstram que os mecanismos de alquilação do ENA em bases nitrogenadas como as do DNA são relacionados aos produtos de decomposição da molécula em nitrilas. DNMP demonstrou um grau incomum de reatividade em relação a outros tipos de pirróis sem o grupo C-nitro no anel (PÉREZ-PRIOR et al., 2009; PÉREZ-PRIOR et al., 2010). A formação do grupo C-nitro conjugado desses compostos formados entre reações do sorbato de potássio e nitrito de sódio sob processamento térmico demonstra ser o responsável pela mutagenicidade em cepas TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* e em Rec-Assay utilizando *Bacillus subtilis*, com ou sem ativação metabólica (NAMIKI; KADA, 1975; HANSEN; TANNENBAUM; ARCHER, 1981).

Em 2015, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), classificou o consumo de carnes processadas como carcinogênico para humanos (grupo 1), devido em partes, ao risco aumentado de desenvolver carcinomas no sistema gastrointestinal de humanos (IARC, 2015). Entretanto, ainda existem muitas lacunas sobre os compostos responsáveis e a influência do processamento industrial sobre esses carcinógenos (DOMINGO; NADAL, 2017). Processos fermentativos são capazes de modular mutagênicos químicos em alimentos. Apesar deste processo possuir rotas complexas e ainda não totalmente elucidadas, adsorção à parede celular de micro-organismos (HASKARD; BINNION; AHOKAS, 2000) e reações enzimáticas (DE OLIVEIRA; BONATTO; HENRIQUES, 2010) são as mais descritas. DNMP e ENA foram submetidos em reações *in vitro* com bactérias entéricas e componentes alimentares. Nitrorredutases, ácidos orgânicos (antioxidantes) e aminoácidos demonstram influência na formação e estabilidade dos compostos *in vitro* (KITO; NAMIKI; TSUJI, 1978; NAMIKI et al., 1981; BINSTOK et al., 1998). A redução do grupo conjugado C-nitro do DNMP em C-amino, gerou resultados negativos de mutagenicidade em testes Ames and

rec-Assay (SHU et al., 1991). Por outro lado, apesar de poucas evidências em relação ao ENA, foi demonstrada maior estabilidade frente ao efeito de antioxidantes e outros componentes alimentares (BINSTOK et al., 1998). No entanto, ainda não estão disponíveis na literatura estudos relacionados ao efeito de culturas *starters* utilizadas na fermentação de alimentos sobre os efeitos no ENA e DNMP em produtos cárneos. Apesar disso, estudos recentes revelam que, em determinadas localidades, os compostos podem representar um risco real aos consumidores, com evidências claras da quantificação dos contaminantes em produtos cárneos submetidos ao uso inadequado de conservantes (MOLOGNONI et al., 2018a).

A hipótese deste estudo reside no fato de que as culturas *starters* utilizadas na fermentação de alimentos podem também modular a formação de compostos carcinogênicos em carnes processadas. Além disso, estudar a formação de possíveis carcinógenos pode ajudar a ciência a melhor compreender as classificações de risco atribuídas ao consumo de produtos cárneos. Dessa forma, este estudo teve por objetivo utilizar culturas selvagens de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para biodegradar os mutagênicos ENA e DNMP *in vitro* e em modelo cárneo processado em diferentes condições experimentais. Um estudo analítico sobre a formação e estabilidade dos compostos de degradação gerados do tipo *N*-nitro, *C*-nitro e *C*-nitroso foi realizado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e padrões analíticos

Toda a água utilizada foi ultrapura produzida pelo sistema de purificação Milli-Q (França). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e os solventes de grau cromatográfico. Tampão de ácido sulfônico zwitteriônico (HEPES), MRS (*de man, rogosa and sharpe*) foram todos fornecidos por Merck KGaA (Alemanha). Padrões de nitrito de sódio, nitrato de sódio, tiocianato de potássio, sorbato de potássio, ácido ascórbico, ácido acetohidroxâmico, cloreto de 3,5-dinitro benzeno (3,5-DNB) e 1-metilimidazol (1-MEI) foram todos fornecidos por Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Alemanhã). *N*-nitrosopirrolidina deuterada (NPYR-d4) foi fornecido por CDN Iso-topes (Canada).

ENA e DNMP foram obtidos de acordo com Kito, Namiki e Tsuji (1978) e Namiki et al. (1981). O 1-nitro-2-metil-3-amino pirrol (NMAP) foi obtido através do método

descrito por Osawa et al. (1986). Dados analíticos sobre a caracterização dos compostos são descritos no capítulo III e no material suplementar desta tese.

As soluções-estoque (1000 mg L⁻¹) de cada composto foram preparadas pesando-se 10 mg de cada analito que foram dissolvidos de acordo com as orientações do fabricante em balões de 10 mL. ENA, DNMP e NMAP foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). A solução de trabalho (1 mg L⁻¹) foi preparada diluindo-se alíquotas das soluções estoques em DMSO. As soluções de padrão interno 3,5 DNB, 1-MEI e NPYR-d4 foram preparadas em metanol na concentração de 10 mg L⁻¹.

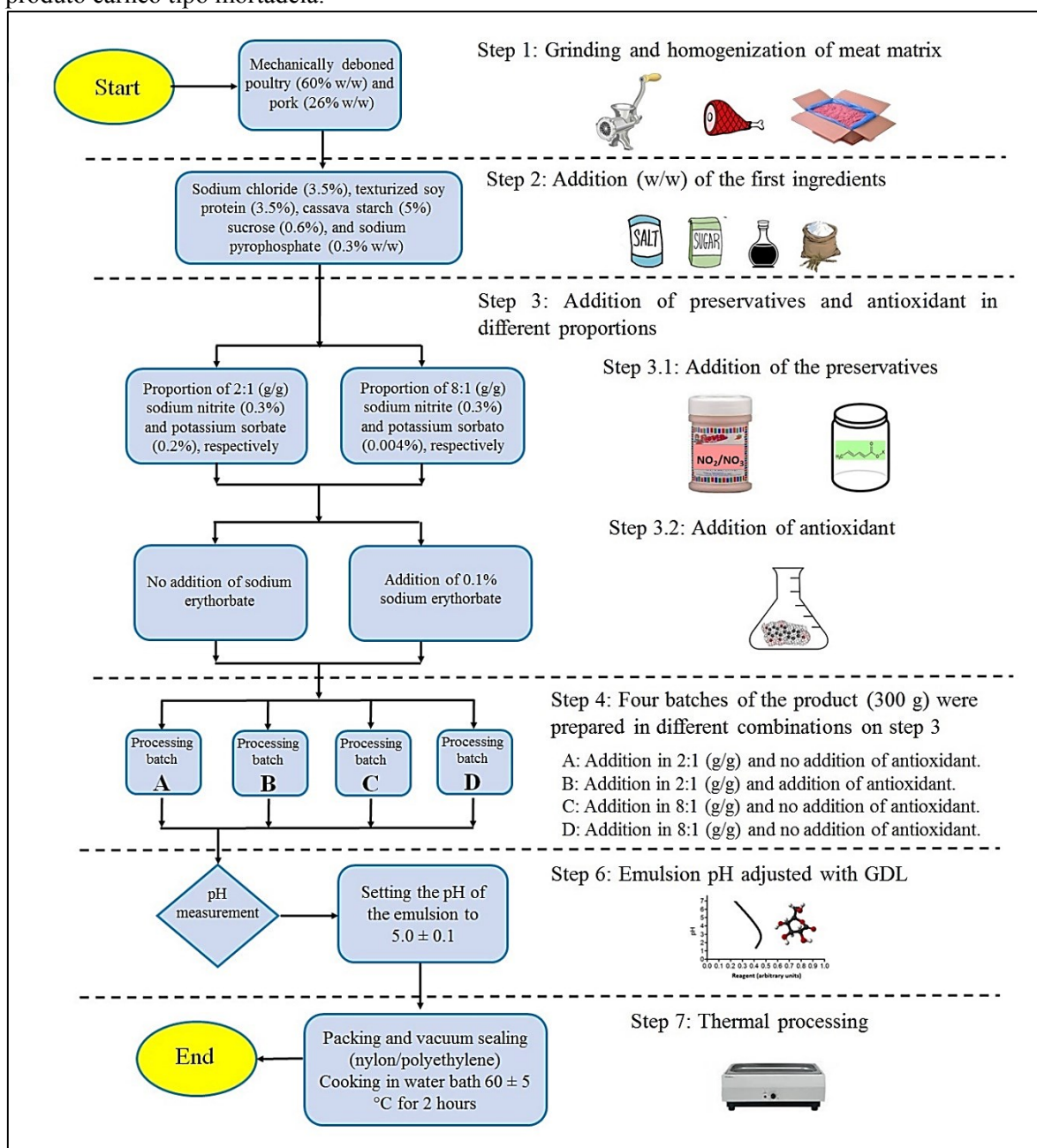
2.2 Micro-organismos

O *L. bulgaricus* LB-UFSC 001 foi utilizado para biodegradar DNMP e ENA em processo fermentativo *in vitro* e em produto cárneo. A cepa foi fornecida pelo Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Santa Catarina (LB-UFSC). A cultura foi conservada em MRS com 20% (m/v) de glicerol a -80 °C.

2.3 Produção das amostras

Amostras de mortadela foram preparadas em uma planta piloto sob diferentes condições de processamento, visando favorecer a formação de ENA e DNMP de acordo com dados disponíveis na literatura, mudando proporção de ingredientes, pH e antioxidantes (KITO; NAMIKI; TSUJI, 1978; NAMIKI et al., 1981; Hartman 1983; BINSTOK et al., 1998; MOLOGNONI et al., 2018b). No total foram preparadas quatro bateladas de 300 g de produto. Ao final de cada batelada, foram retiradas três alíquotas de emulsão cárnea de aproximadamente 50 g. As amostras foram embaladas a vácuo em embalagens nylon/polietileno e tratadas termicamente a 60 ± 2 °C. Ao final do processo foram estocadas a -80 °C até as análises. Carne mecanicamente separada de aves foi utilizada como matéria-prima (60%). O pH das amostras foi ajustado próximo a 5,0 com adição gradativa de 0,05% de glucona-delta-lactona (GDL) (Kraki, Brasil). A porcentagem total necessária de GDL foi de 1,5%. O fluxograma apresentado na figura 2, descreve em detalhes os processamentos em escala piloto.

Figura 1– Fluxograma das principais etapas do processamento utilizados na elaboração do produto cárneo tipo mortadela.



Fonte: Próprio autor.

2.4 Instrumentação analítica

No estudo foram utilizados um sistema de cromatografia líquida com detecção por UV-VIS Alliance 2795 Waters Corporation (EUA), um espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Avance 200 Bruker GmbH (Alemanhã), espectrômetro de massa triploquadropolo linear híbrido com dispositivo de armadilha de íons QqLIT-

ESI/MS/MS, equipado com fonte por eletrospray (Sciex, EUA), acoplado ao cromatografo líquido Infinity 1290 Agilent (Alemanha). Uma eletroforese capilar por zona com detecção por arranjo de diodos Agilent CE 7100 (Alemanhã) também foi empregada. Fases estacionárias de di-isopropil-3-aminopropil (Zorbax column 150 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m), fenil-hexil (Zorbax column 50 mm x 4,6 mm i.d., 3,5 μ m), C₁₈ (Zorbax column 150 mm x 3,5 mm i.d., 3,5 μ m) marcas Agilent Technology (EUA) e C₁₈ (Venusil XPB, 150 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m particle size) marca Bonna-Agela Technologies Inc. (EUA) foram utilizadas.

2.5 Abordagens analíticas experimentais

De acordo com a tabela 1, podem-se observar em detalhes todas as abordagens analíticas executadas no estudo. Por outro lado, um único método de extração foi desenvolvido para as análises por LC-QqLIT-ESI/MS/MS. Extração com fase sólida dispersiva (d-SPE) foi realizada como segue: 2,0 \pm 0.1 g de amostras foi pesada diretamente em tubos de polipropileno 50 mL. Foram adicionados 10 mL de solução de extração contendo 90% acetonitrila (ACN) acidificada com 0,1% ácido fórmico. Foi adicionado padrão interno conforme a tabela 1 e seguido a agitação orbital vigorosa por 20 min. Logo após, os tubos foram centrifugados a 3488 g durante 10 min a 4 \pm 1 °C. O sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno de 15 mL. Foram adicionados 200 mg de sulfato de magnésio e 100 mg de carvão ativado. Foram agitados em vórtex e depois submetidos a -30 \pm 10 °C por uma hora. Ao final do tempo, foram centrifugados a 3488 g durante 10 min a 4 \pm 1 °C. Todo o conteúdo foi transferido para tubo de polipropileno (50 mL) e completamente seco sob fluxo de nitrogênio a 25 \pm 5 °C. Os extratos foram ressuspensos com 0,60 mL de solução metanol a 70% (v/v) e 0,1% (v/v) ácido fórmico.

Para as análises dos íons nitrito e nitrato por eletroforese capilar de zona, um extração aquosa foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Della Betta et al. (2016).

As amostras submetidas ao estudo *in vitro* contendo somente HEPES, biomassa e mutagênicos foram diretamente filtradas utilizando PTFE 0,22 μ m.

Tabela 1 – Abordagens analíticas utilizadas durante o estudo sobre a biodegradação do 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP) e ácido etilnitróico (ENA) por cepas selvagens de *L. bulgaricus*.

Mensurando (Faixa de trabalho)	Instrumentação analítica	Método de separação	Abordagem para identificação/ quantificação	Critério de aceitabilidade	Referência
2-metil-1,4-dinitro pirrol, 1-nitro-2-metil-3-amino pirrol, 2-metil-1H-pirrol, 3-amino pirrol e 1-H- pirrol (10 -500 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	LC-QqLIT- ESI/MS/MS	Cromatografia líquida com fase estacionária di- isopropil-3-amino propil e fases móveis A- acetonitrila e B- 0,1% ácido fórmico	Identificação: Monitoramento múltiplo de reações utilizando <i>scheduled</i> e aquisição dependente de informação e <i>enhanced product ion</i> (<i>Scheduled</i> – MRM- IDA – EPI) Quantificação: Calibração interna com 1-metil imidazol.	Incerteza de medição inferior a 41% para valores entre 10 - 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 32% para superiores a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Razão entre os íons de fragmentação $\geq 10\%$	^a Adaptação de Molognoni et al. (2018b).
Ácido etilnitróico (ENA), óxido de acetonitrila (ACNO), ácido acetohidroxâmico (ACH), e acetamida (ACD) (0,5 – 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	LC-QqLIT- ESI/MS/MS	Cromatografia líquida com fase estacionária fenil-hexil e fases móveis A- metanol e B- 0,1% ácido fórmico	Identificação: <i>Scheduled</i> - MRM – IDA - EPI. Quantificação: Calibração interna com N- nitropirrolidina.	Incerteza de medição inferior a 41%.	Desenvolvimento <i>in house</i>
Ácido sórbico (0,025 – 1000 mg kg^{-1})	LC-ESI/MS/MS	Cromatografia líquida com fase estacionária di- isopropil-3-amino propil e fases móveis A- acetonitrila e B- 0,1% ácido fórmico	Identificação: MRM. Quantificação: Calibração interna com cloreto de 3,5- dinitro benzeno.	Incerteza de medição inferior a 25%.	Molognoni et al. (2018a).
Íons nitrito e nitrato 5,0 – 450 mg kg^{-1}	CZE-DAD	Capilar de sílica dimensões: 48,5 cm x 8,5 cm x 75 μm . Comprimento de onda 210 nm. Injeção da amostra - 50 mbar 3s^{-1} ; Voltagem 20 kV;	Identificação: Tempo de migração utilizando padronização interna. Quantificação: Calibração interna com tiocianato de potássio.	Incerteza de medição inferior a 32%.	Della Betta et al. (2016).

^a Adaptado com a inclusão de novos analitos.

Fonte: Próprio autor.

2.6 Identificação de metabólitos e marcadores reacionais

A identificação dos metabólitos e outros marcadores foi realizada com base em dados prévios da literatura a respeito da degradação do ENA e do DNMP por reações químicas (PÉREZ-PRIOR et al., 2009) e enzimáticas (SHU et al., 1991). Entretanto, as medidas foram adaptadas a uma maior especificidade e sensibilidade utilizando medidas por LC-QqLIT-ESI/MS/MS. No desenvolvimento dos métodos foram utilizadas substâncias isoladas de ENA, DNMP, ácido acetohidroxâmico (ACH), 2-metil-3-amino-1-nitropirrol (NMAP), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Por outro lado, para obter respostas para óxido de acetonitrila (ACNO) e 2-metil-1H-pirrol (MPYR), foi utilizado modelos de correlação canônica empregando experimentos com gradiente de concentração dos substratos, ENA, DNMP e processos fermentativos na faixa de 5 a 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A razão das derivadas calculadas nos modelos de regressões (1): eixo x1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$ do ENA e DNMP) *versus* eixo y1 (área em cps do ENA e DNMP) e (2) eixo x2 ($\mu\text{g kg}^{-1}$ ENA e DNMP) *versus* eixo y2 (área em cps do ACNO e MPYR) foram realizadas utilizando pureza do pico e linearização da função. Para isso, ferramentas do sistema QqLIT-ESI/MS/MS foram utilizadas para o monitoramento múltiplo de reação em triplo quadrupolo, janela de tempo para scan (*Scheduled*) e aquisição dependente de informação através de experimentos utilizando dispositivo Qtrap e softwares Analyst e MultiQuant Sciex (EUA).

2.7 Incubação do *L. bulgaricus* com compostos mutagênicos

A metodologia descrita por Shu et al. (1991), foi utilizada após adaptações. As culturas de *L. bulgaricus* foram reativadas por uma noite e centrifugadas a 3800 g por 10 min sob refrigeração a 4 °C. A biomassa foi lavada com 10 mL de solução tampão de HEPES 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,6) em frascos de vidro. A densidade celular foi definida em (10⁸ células mL⁻¹) e avaliada por análise turbidimétrica utilizando um espectrofotômetro fornecido pela Thermo Fisher Scientific Inc. (EUA) em 600 nm. Cada cultura foi ressuspensa em um volume final de 1 mL de HEPES para inóculo. As reações *in vitro* ocorreram em tubos de polipropileno de 1,5 mL com os compostos presentes na faixa de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (juntos e separados), utilizando células viáveis e lisadas. Controles em branco e de resultados falsos positivos foram realizados. Para o estudo no produto cárneo, procedimentos semelhantes foram realizados. Utilizando $2,0 \pm 0,1$ g amostra em tubo de

polipropileno 50 mL, foi adicionado 1 mL de inócuo e homogeneizado em agitador de tubos até formação de uma pasta. O estudo foi realizado com e sem a fortificação dos compostos submetidos a fermentação.

Por fim, todos os tubos foram incubados a 37 ± 1 °C. A reação foi cessada em ultra freezer e submetidas a diferentes abordagens químicas como descreve o item 2.3. Estudos univariados de cinética foram aplicados ao *L. bulgaricus*, aplicando variáveis como tempo de fermentação (0 a 24 horas) e gradiente de concentração dos mutagênicos (5 a 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$).

2.8 Critério de aceitabilidade das medidas e modelos estatísticos

Os métodos analíticos empregados neste estudo (reproduzidos da literatura e/ou desenvolvidos *in house*) foram submetidos a critérios de desempenho e a estimativas das suas incertezas.

A seletividade foi verificada pela análise de solventes, brancos analíticos e amostras processadas quanto às interferências isobáricas, picos concomitantes proveniente de matrizes e contaminações do sistema entre as corridas. Considerou-se seletivo o processo de medição que não apresentou picos interferentes em torno dos tempos de retenção dos analitos, ao se comparar cromatogramas obtidos antes e depois a fortificação dos analitos.

As curvas analíticas utilizadas para a quantificação e/ou identificação dos analitos foram preparadas utilizando padronização interna e com no mínimo seis níveis de concentração (incluindo zero), preparadas em triplicatas independentes. Relações funcionais ponderadas entre sinais analíticos e parâmetros (concentração, tempo, cps, entre outros) foram utilizadas para interpolação dos valores. O critério de aceitação desses modelos foi através do coeficiente de regressão médio ($R^2 \geq 0,950$).

Para os modelos preditos de substrato *versus* metabólito utilizados no item 2.6, foi realizada a linearização com posterior análise de regressão linear simples, após testes de normalidade (teste Anderson-Darling) e homodasticidade (teste Bartlett) ambos com 95% de probabilidade. Os efeitos randômicos referentes às instrumentações e aos processos analíticos foram obtidos através de variâncias propagadas sem *outliers* (Dixon test) e teste de variância (ANOVA fator único), todos a 95% de probabilidade de acerto. Variáveis como tempo, equipamentos, estabilidade dos extratos, analistas e analitos foram

considerados nos cálculos. A tolerância referente à dispersão dos resultados, foi descrita na tabela 1, de acordo com a faixa do mensurando, técnica analítica e composto químico.

A estimativa da incerteza de medição obtida para cada parâmetro do estudo foi calculada empregando modelagem matemática com expansão de séries de Taylor em primeira ordem. Todas as variâncias e covariâncias (experimentais e herdadas) foram propagadas após a conversão em incertezas padrão (68% de probabilidade), utilizando distribuições simétricas e de t-Student. A abrangência final de acerto do parâmetro foi calculada expandindo a incerteza padrão combinada com coeficientes de abrangência (95%).

Testes estatísticos exploratórios e confirmatórios foram empregados durante os estudos sobre os processamentos cárneos. Test-t (presumindo variâncias equivalentes – 95%) e Kolmogorov-Smirnov (95%) foram utilizados para comparação de valores médios sem considerar a incerteza do resultado e dependendo da densidade da distribuição. Por outro lado, o erro normalizado (En) foi utilizado para a comparação dos resultados utilizando suas incertezas com 95% de probabilidade de acerto.

Detalhes do modelo matemático utilizado nas estimativas de incerteza, variâncias, covariâncias e abordagens de comparação de abrangências podem ser vistos no Material Suplementar desta tese.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Biotransformação dos compostos mutagênicos por *L. bulgaricus* e os metabolitos gerados

Metodologias inovadoras têm sido propostas utilizando BAL para a redução e/ou inibição de compostos tóxicos presentes nos alimentos, como na degradação de aminas biogênicas e hidrocarbonetos aromáticos heterocíclicos em carnes processadas (BARTKIENE et al., 2017). Entretanto, a dificuldade de medir ENA e DNMP em matrizes complexas, aliada à falta de dados disponíveis justifica a escassez de informações a respeito (MOLOGNONI et al., 2018b). Neste estudo, *L. bulgaricus* degradou os compostos mutagênicos ENA e DNMP em todos os meios avaliados, com sensibilização do micro-organismo a partir de $\pm 10 \mu\text{g L}^{-1}$ (limite analítico de detecção) dos mutagênicos no meio. De maneira semelhante à hipótese formulada por Shu et al. (1991), utilizando bactérias entéricas, *L. bulgaricus* pode ter utilizado de grupo de

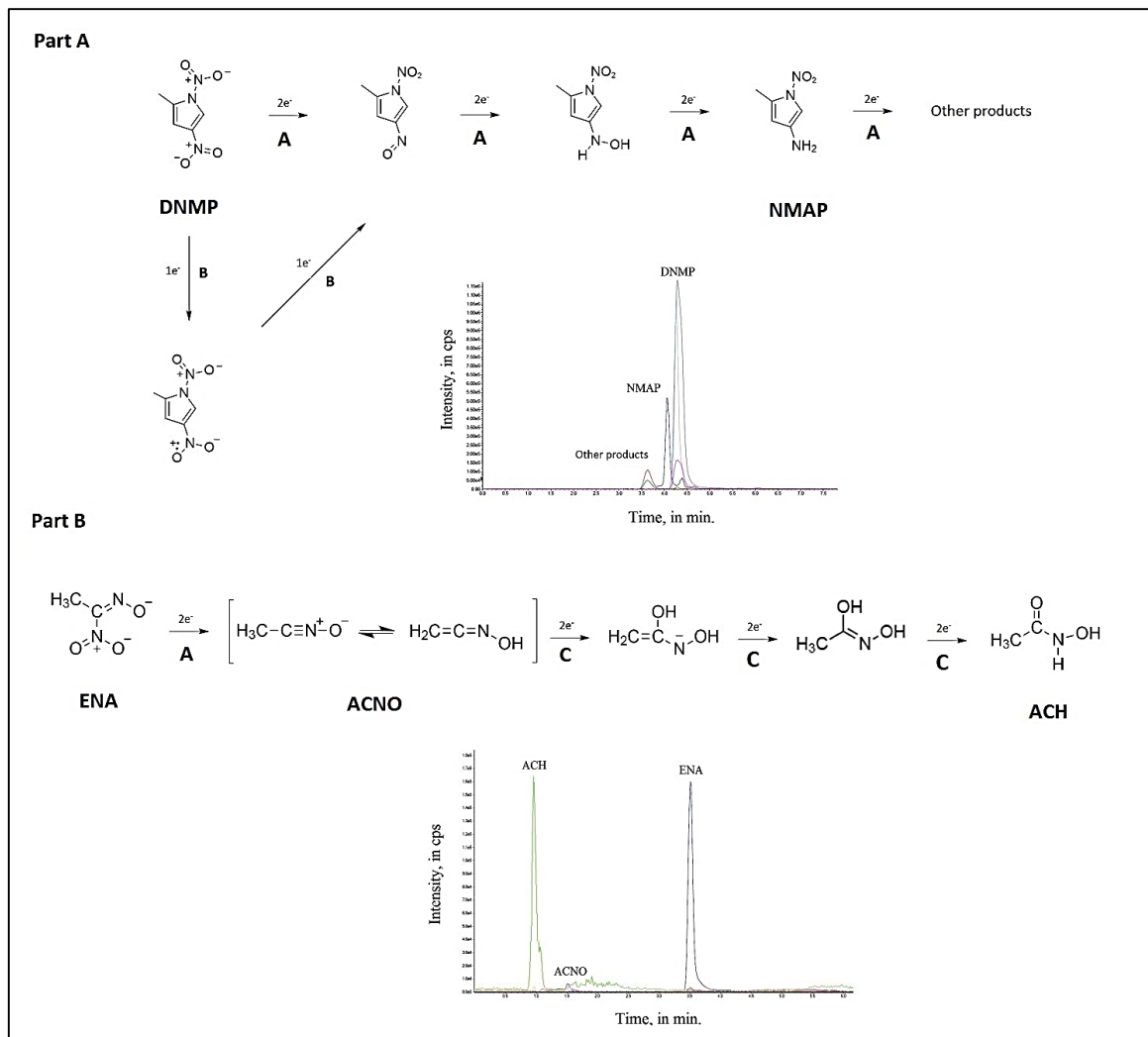
enzimas nitrorredutases para remediar os compostos. As nitrorredutases compreendem uma família de enzimas capazes de metabolizar nitro compostos utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD(P)H) para transporte de elétrons. Essas enzimas desempenham um papel fundamental na metabolização de nitro compostos, tendo aplicações biotecnológicas e importância clínica (KOBORI et al., 2000). Essas enzimas podem ter papel fisiológico importante atuando na resposta ao estresse oxidativo (DE OLIVEIRA; BONATTO; HENRIQUES, 2010).

Ao utilizar-se de uma BAL com potencial tecnológico em reações *in vitro* e matriz alimentar contendo DNMP, as nitrorredutases catalisaram a transferência de elétrons via $\text{NADH} \gg \text{NAD}^+$, transformando o grupo *C*-nitro em intermediários tipo *C*-nitroso até formação de aminas substituídas. Isso foi evidenciado com a presença de NMAP no meio reacional (figura 3). Shu et al. (1991), também constataram a presença desse produto, que conferiu a perda da mutagenicidade em teste *Ames* e *Rec-assay* utilizando cepas bacterianas. Apesar de não ter sido mencionado no estudo as possíveis causas da perda da mutagenicidade do DNMP, acredita-se que pode estar associada à inversão do fluxo de elétrons da molécula. A perda do grupo *C*-nitro inverteu o fluxo de elétrons devido ao grupamento *N*-nitro ainda estar presente na estrutura química do NMAP (figura 3). De acordo com o esquema apresentado na figura 3, evidenciou-se que a redução se deu através da rota II. Isso porque, ao doar somente um elétron (*futile redox cycle*), radicais superóxidos seriam gerados podendo regenerar o DNMP. Isso não foi evidenciado em nenhum momento do estudo. De forma surpreendente, *L. bulgaricus* precisou de no máximo 30 minutos de fermentação para degradar uma ampla faixa de concentração de DNMP (10 a 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$) em todos os meios avaliados, mesmo sem adição de substratos. Além disso, um estresse oxidativo poderia ter sido gerado durante a rota I, inviabilizando as células microbianas em presença de radicais livres (PETERSON et al., 1979). Isso também não foi evidenciado, pois *L. bulgaricus* se multiplicou ao final de todos os testes avaliados quando colocado em meios de cultivo para o propósito. Além da detecção do NMAP, evidenciou-se a geração de outros grupos aminos ligados ao pirrol (Figura 3). Isso demonstra que as nitrorredutases podem atuar em redução sequencial do composto, convertendo-o todo em hidroxilaminas e aminas de baixa massa molecular como MPYR, entre outras não investigadas. A geração de íons $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ no meio contribui para a hipótese da denitrosação do DNMP no meio.

Pérez-Prior et al. (2009) revelaram aspectos químicos relevantes do ENA, como constantes de dissociação e decomposição em diferentes solventes. De maneira

semelhante ao ocorrido na degradação de DNMP por cepas de *L. bulgaricus*, acreditamos que a redução inicial do ENA foi devida às nitrorredutases, com evidências da formação de íons $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ e intermediários estáveis de nitrilas como ACNO. Entretanto, ao contrário da redução sequencial ocorrida com o DNMP, não foram identificados produtos que evidenciam essa mesma condição, como na geração de acetamidas. Os dados analíticos sugerem um ataque nucleofílico via carbocátion e não ao nitrogênio da molécula ACHO. Nesse processo, a formação de intermediários com ligações $\text{C} = \text{O}$ explica melhor a formação do principal produto estável detectado e quantificado ao final das reações, o ácido acetohidroxâmico (figura 3). Dessa forma, enzimas NHases, como nitrilas hidratases podem estar atuando juntamente com nitroredutases para biodegradar o composto mutagênico. O composto gerado ACH não é considerado mutagênico, além de ser atualmente muito empregado em aplicações clínicas como inibidor da urease.

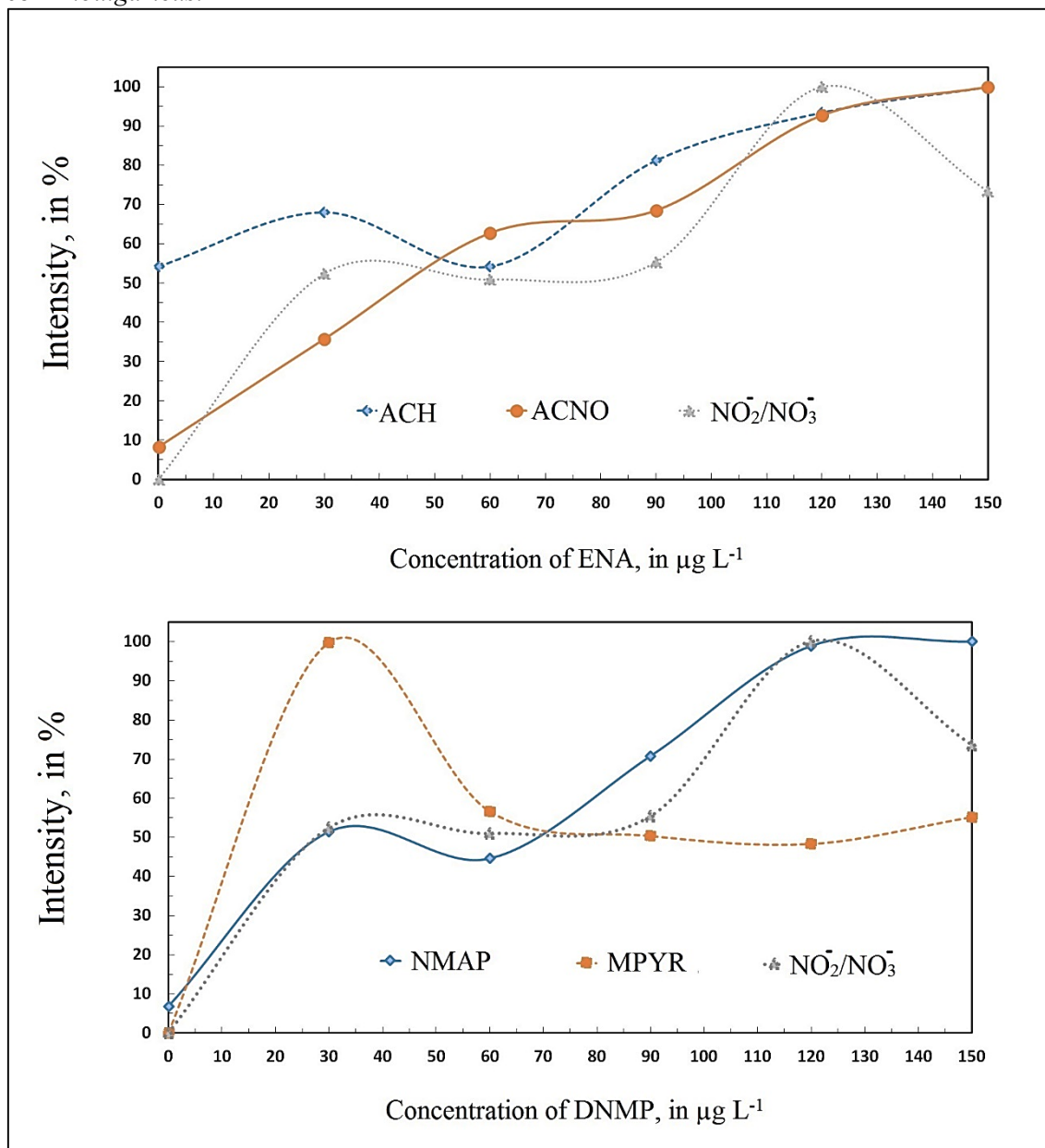
Figura 2– Esquema sobre a bioconversão das espécies mutagênicas ácido etilnitrílico (ENA) e do 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP) por cepas selvagens de *L. bulgaricus* e as principais rotas e produtos reacionais formados. Onde NMAP: 1-nitro-2-metil-3-amino pirrol, ACNO: óxido de acetonitrila e ACH: ácido acetohidroxâmico.



Fonte: Próprio autor.

De acordo com a figura 4, pode-se observar a formação crescente dos metabólitos ACH, ACNO, NMAP, MPYR, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ quando *L. bulgaricus* foi submetido a um gradiente de concentração de ENA e DNMP durante o processo fermentativo. Nas partes superior e inferior da figura 4, os metabólitos ACNO, NMAP e $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ coincidem nos pontos de máximo ($a > 0$), demonstrando a denitrosação das moléculas (R^2 entre 0,94 a 0,99). O sinal analítico do ACNO demonstra mais estabilidade ao ser submetido à variação de concentração de ENA, com máxima formação em $150 \mu\text{g L}^{-1}$. Já MPYR parou de ser formado quando a concentração do mutagênico foi superior a $60 \mu\text{g L}^{-1}$. Isso pode estar relacionado à falta de substrato durante o processo, como cofatores essenciais ao metabolismo microbiano (SHU et al., 1991).

Figura 3– Gráfico da concentração dos mutagênicos ácido etilnitroso (ENA) e do 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP) em $\mu\text{g L}^{-1}$ versus intensidade de sinal dos metalólitos (em %), óxido de acetonitrila (ACNO), ácido acetohidroxâmico (ACH), 1-nitro-2-metil-3-amino pirrol (NMAP), 3-amino pirrol (MPYR) e o somatório dos íons nitrito e nitrato ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$), em reações *in vitro* com *L.bulgaricus*.



Fonte: Próprio autor.

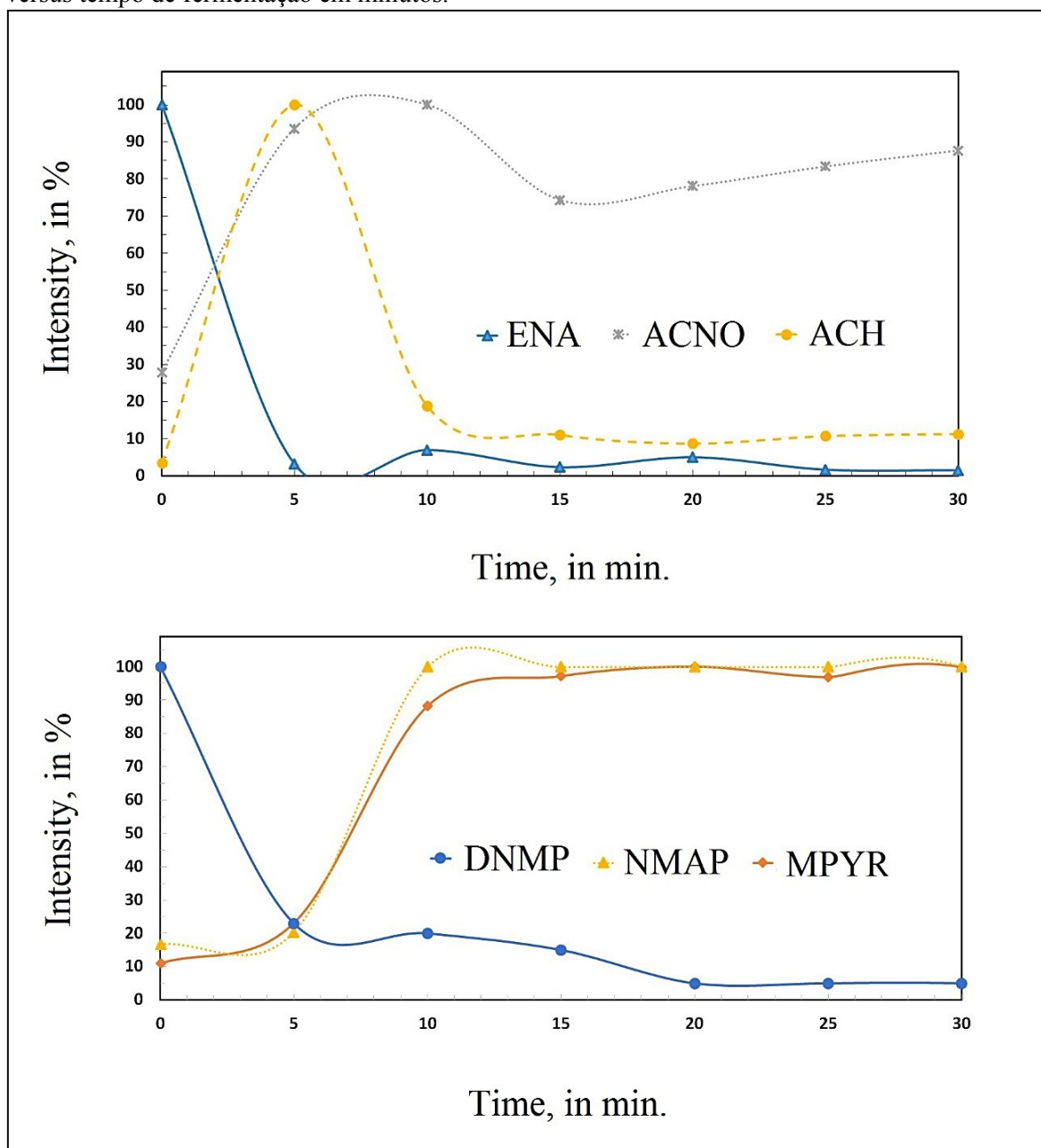
3.2 Processamento cárneo versus formação de compostos mutagênicos

Dados úteis sobre a formação e a estabilidade do ENA e DNMP em reações *in vitro* foram reportadas pela literatura, ao serem submetidos a adição de antioxidantes, aminoácidos e tratamento térmico (OSAWA et al., 1986; BINSTOK et al., 1998). No entanto, é a primeira vez que um estudo analítico detalhado sobre a formação, estabilidade

e degradação do ENA e DNMP em reais condições de processamento de carnes é reportado. Ao utilizar diferentes processamentos e fermentação por culturas *starter* com reconhecido potencial tecnológico, resultados inovadores foram obtidos neste estudo. De acordo com o estudo cinético apresentado na Figura 5, o *L. bulgaricus* precisou de 5 min de fermentação com 2 g de carne processada para diminuir 80% da concentração dos mutagênicos. Para degradar um total de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ adicionado de forma exógena, foram necessários 20 min de fermentação para diminuir 90% de intensidade de sinal equivalente. Após esse tempo, foram obtidos valores de elevada incerteza ($> 50\%$), decorrentes da limitação analítica para valores em nanogramas. Os produtos gerados no produto cárneo foram semelhantes aos obtidos em tampão biológico *in vitro* (figura 4), reforçando a hipótese levantada sobre as reações. Pode-se observar uma máxima formação de ACH, NMAP e MPYR, coincidentemente nos dez primeiros minutos. De forma contrária, o ACNO foi consumido nesse tempo de reação, assim como o ENA. Esses resultados reforçam a hipótese de enzimas do grupo NHases estarem agindo em conjunto com as nitrorredutases.

Por outro lado, os resultados dos íons $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ em matriz cárnea foram inconclusivos. A diferenciação do conteúdo exógeno e endógeno dos íons não demonstrou significado. Assim, a correlação do parâmetro com os outros de interesse não foi realizada.

Figura 4– Estudo cinético da biodegradação do ácido etilnitrólico (ENA) e do 2-methyl-1,4-dinitroprrole (DNMP) em mortadela após o tratamento com *L. bulgaricus*. Gráfico da intensidade de sinal (em %) do ENA, DNMP, óxido de acetonitrila (ACNO), ácido acetohidroxamico (ACH), 1-nitro-2-methyl-3-amino pyrrole (NMAP), 3-amino pyrrole (MPYR) versus tempo de fermentação em minutos.



Fonte: Próprio autor.

Resultados positivos para ENA ($> 5,00 \mu\text{g kg}^{-1}$) e DNMP ($> 12,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) foram obtidos para todas as mortadelas produzidas com o nitrito e sorbato, mesmo com variação nas proporções e adição de antioxidante eritorbato de sódio. No entanto, os processamentos A (2:1 nitrito e sorbato, sem eritorbato), B (2:1 nitrito e sorbato, com eritorbato), C (8:1 nitrito e sorbato, sem eritorbato) e D (8:1 nitrito e sorbato, com eritorbato) apresentaram diferença significativa entre os resultados ($P < 0,05$). De acordo

com a figura 6 (parte A), as maiores concentrações de ENA e DNMP foram observadas quando a proporções dos conservantes eram de 8:1 (nitrito de sódio:sorbato de potássio). Apesar das formulações das mortadelas utilizando 2:1 (nitrito de sódio:sorbato de potássio) obtiveram concentrações menores em relação a outras proporções, todas apresentaram resultados positivos para ENA e DNMP.

Desde a década de 70, o uso de antioxidante tem sido a abordagem mais comum para controlar a formação de compostos carcinogênicos tipo *N*-nitroso em produtos cárneos (MOTTRAM et al., 1975). Em nosso estudo, o uso do antioxidante eritorbato não demonstrou influência na inibição do ENA, mesmo quando a mortadela foi processada utilizando o pior tratamento para a formação do composto (processamento B). Ao contrário, a concentração do DNMP foi inferior quando o antioxidante estava presente, reduzindo significativamente a concentração do composto nas formulação de 8:1 (nitrito de sódio:sorbato de potássio) ($P < 0,05$). Estudos demonstraram a ação do ácido ascórbico, suco de vegetais (abóbora e couve) e cisteína na inibição do DNMP (OSAWA et al., 1980). O ácido ascórbico pode reduzir o grupo *C*-nitro conjugado em amino, formando NMAP. Já o mecanismo de inativação pela cisteína envolve o ataque direto do anel aromático do DNMP, seguido da eliminação do grupo *C*-nitro, originado em produtos diferentes do NMAP (OSAWA et al., 1980).

Contudo, com a utilização do nitrito de sódio em maior proporção em relação ao sorbato de potássio demonstrou ser a maior influência na formação do ENA e DNMP nas mortadelas. Mesmo na presença do eritorbato de sódio com a proporção de 8:1 (nitrito de sódio: sorbato de potássio), a formação dos mutagênicos foi constatada (Figura 6, parte A). Nossos resultados corroboram com os poucos dados disponíveis na literatura, que afirmam que esses compostos são formados em meio ácido ($\text{pH} < 5,5$), sob aquecimento e com alta proporção de nitrito em relação ao sorbato, idealmente em uma relação de 8:1 (KADA 1974; NAMIKI; KADA, 1975; KITO; NAMIKI; TSUJI, 1978; NAMIKI et al., 1981). No entanto, Hartman (1983) afirmou que os compostos podem se formar mesmo quando baixas proporções de nitrito em relação ao sorbato são utilizadas (até 2:1). As evidências demonstradas na figura 6 (parte A), são concordantes com a literatura e demonstram que os mutagênicos também são formados quando baixas proporções dos conservantes estão no processamento. Binstok et al. (1998), ao avaliarem condições de pH, temperatura e concentração de reagentes na formação de ENA e DNMP *in vitro* (em um meio reacional que simulava um produto cárneo), constataram que a formação do DNMP era reduzida na presença do ácido ascórbico. Por outro lado, o ENA foi detectado

em todos os sistemas estudados, demonstrando pouca influência quando o ácido ascórbico ou a cisteína estavam presentes (BINSTOK et al., 1998).

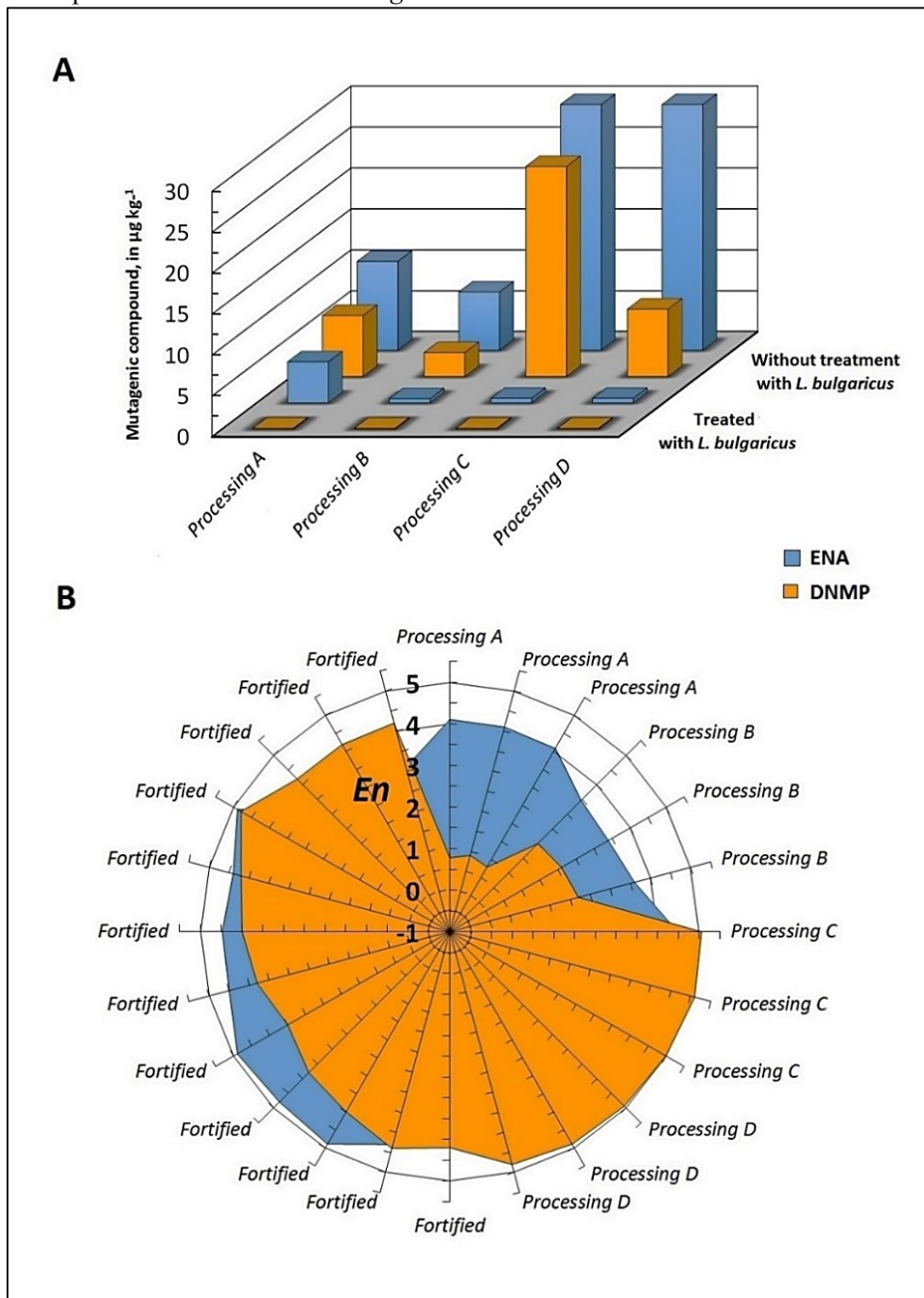
Diversas pesquisas recentes demonstram resultados promissores na substituição total ou parcial do nitrito em carnes processadas. Culturas *starter* que convertem a metamioglobina em nitrosomioglobina, pigmentos naturais, extratos vegetais, fibras, entre outras formas, vêm sendo citadas (ALAHAKOON et al., 2015; SELLIMI et al., 2017; DE MAERE et al., 2018). Contudo, o nitrito de sódio continua a ser considerado um ingrediente único e aparentemente insubstituível, contando com fomento de pesquisas sobre seu papel na otimização de processos industriais e na segurança alimentar (SINDELAR; MILKOWSKI, 2012; FENG et al., 2016; GHASEMI; JEDDI, 2017). Com diversas alternativas apresentadas, as evidências demonstram que a utilização do conservante ainda está enraizada nos mais diversos países do mundo, e que a sua substituição ainda depende de mudanças culturais, econômicas e científicas, uma vez que diversas alternativas já foram apresentadas à sua substituição total ou parcial.

3.3 Ação desmutagênica do *L. bulgaricus*

Como pode ser observado na figura 6, *L. bulgaricus* degradou o ENA e DNMP em todas as mortadelas (parte A). Isso também foi observado quando as substâncias puras de síntese foram adicionadas intencionalmente em ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) diretamente as mortadelas antes do tratamento. Dessa forma, todas as mortadelas sofreram redução da concentração de ENA e DNMP após serem submetidas ao tratamento desenvolvido com culturas selvagens de *L. bulgaricus*. De acordo com a figura 6 (parte B), as distribuições dos resultados com 95% de probabilidade de acerto não obtiveram concordância antes e após submetidos ao tratamento ($En > 1$). Com exceção para os resultados de DNMP no processamento A (2:1 nitrito: sorbato, sem adição de eritorbato), os resultados foram concordantes ($En \leq 0.9$), não demonstrando influência do tratamento com *L. bulgaricus* sobre a concentração do mutagênico. Entretanto, devido à baixa concentração do DNMP na mortadela submetida ao tratamento, os resultados apresentaram elevadas abrangências (incerteza expandida relativa $> 41\%$), comprometendo a confiabilidade do dado. Já as maiores diferenças apresentadas entre os resultados foram nas mortadelas elaboradas com alta proporção de nitrito ao sorbato (processamento C e D) e as fortificadas com substância pura. Essas amostras apresentaram as maiores concentrações de ENA e DNMP após o processamento e foram efetivamente efetivamente biodegradados ($En > 5$).

Contudo, o tratamento desenvolvido neste estudo com cepas selvagens de *L. bulgaricus* demonstrou êxito na biodegradação dos compostos mutagênicos formados no uso concomitante de conservantes e processamento cárneo estudado. Apesar dos problemas gerados com o uso conjunto dos conservantes poderem ser minimizado com boas condutas de fabricação, esse estudo apresentou um potencial método para a bioconversão de outros compostos tóxicos gerados no processamento de alimentos.

Figura 5– Resultados da formação e biodegradação dos compostos mutagênicos ácido etilnitroso (ENA) e do 2-metil-1,4-dinitro pirrol (DNMP) em mortadelas produzidas sob diferentes proporções de conservantes e antioxidantes. Parte A: formação dos compostos após os diferentes processamentos (A, B, C e D) antes e depois do tratamento com culturas selvagens de *L. bulgaricus*. Parte B: gráfico do erro normalizado (En) demonstrando a diferença das abrangência da parte A após o tratamento com *L. bulgaricus*.



Processamento A: proporção de conservantes em 2:1 (nitrito de sódio e sorbato de potássio) sem adição de eritorbato de sódio. Processamento B: proporção de conservantes em 2:1 (nitrito de sódio e sorbato de potássio) com adição em 0,1% de eritorbato de sódio. Processamento C: proporção de conservantes em 8:1 (nitrito de sódio e sorbato de potássio) sem adição de eritorbato de sódio. Processamento D: proporção de conservantes em 8:1 (nitrito de sódio e sorbato de potássio) com adição em 0,1% de eritorbato de sódio.

Fonte: Próprio autor.

3.4 Confiabilidade do estudo: incertezas teóricas e experimentais

Todos os métodos analíticos reproduzidos da literatura ou desenvolvidos ao propósito deste estudo apresentaram desempenho considerado aceitável ao propósito. A seletividade dos métodos foi comprovada em todos os extratos, mesmo quando provenientes de matrizes alimentares complexas como mortadelas fermentadas. Exceto em medidas de ACH, ACNO, não foram observadas interferências que pudessem comprometer a especificidade e seletividade dos métodos durante a detecção e/ou quantificação. ACH e ACNO tiveram interferências providas do uso da acetonitrila como fase móvel, sendo substituída com êxito por metanol. A variabilidade dos processos de medição ficaram em torno de 5 a 41% de variação. A linearização e análises de regressão geraram coeficientes superiores a 0,99, baixos resíduos e taxas de recuperação dos valores interpolados entre 70 a 120%. Por outro lado, a correlação dos modelos preditos de substrato + micro-organismos *versus* metabólitos apresentaram coeficientes de regressão na faixa de 0,94 (ex. ENA *versus* ACNO) e 0,99 (ex. DNMP *versus* NMAP). A razão das derivadas obtidas em regressões correlacionadas apresentou-se na faixa de 0,4 a 0,8. A razão da derivada igual a um representaria um resultado perfeito na biotransformação de ENA e DNMP em produtos metabolizados pelo *L. bulgaricus*. Isso raramente acontecerá, mesmo em condições ideais de conversão molecular, porque a substância não é 100% pura, e tão pouco o rendimento das reações químicas. Além disso, o modelo matemático propagou incertezas experimentais e teóricas provenientes de equipamentos, analistas e de natureza biológica.

As incertezas dos parâmetros analíticos de todo o estudo demonstram haver diferentes perfis, de acordo com as espécies químicas e os meios analisados. As menores incertezas foram atribuídas aos parâmetros obtidos através de métodos reconhecidos pela literatura (com ou sem modificações) em meios líquidos (reações *in vitro*), obtendo incertezas padrão expandidas relativas de 25%. Entretanto, mesmo sendo métodos de fácil reprodução e com faixas elevadas de concentração (na ordem de mg kg^{-1}), as análises de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ obtiveram incertezas elevadas durante o estudo. Os parâmetros de desempenho dos métodos desenvolvidos *in house* para medir ENA, ACH, ACNO, MPYR, entre outros compostos de baixa massa molar, obtiveram as maiores incertezas do estudo (até 41%). Isso foi devido a propagação de incertezas referente a resíduos de regressões, legibilidade das medidas ($0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$) e variabilidade das medições. Por outro lado, as ferramentas analíticas empregando métodos híbridos de espectrometria de

massas utilizando dispositivo Qtrap conferiram maior confiabilidade reduzindo as taxa de resultados falsos positivos de substancias não isoladas do meio reacional.

No geral, as incertezas experimentais foram influenciadas por três principais fatores: 1°) utilização de um único método de extração (d-SPE) para analisar diferentes espécies químicas com características químicas distintas e em vários meios; 2°) elevado ruído instrumental em transições abaixo 50 m/z com resolução infinita limitada em 0,01 Da; 3°) efeito da proteólise de micro-organismos nas mortadelas submetidas a diferentes tempos de fermentação, conferindo características distintas para amostras iguais. No entanto, a minimização de erros provenientes a instabilidade das espécies químicas em longas análises e a adoção de um erro médio para simular as características das amostras o estudo demonstrou confiabilidade nos resultados.

As incertezas teóricas foram principalmente referentes à elucidação dos mecanismos reacionais e rotas metabólicas utilizadas pelo *L. bulgaricus* para biodegradação dos compostos mutagênicos. A identificação das principais enzimas responsáveis, após o isolamento e purificação do meio, forneceria mais evidências para este estudo. Além disso, a toxicidade dos produtos provenientes da biotransformação microbiana NMAP e ACH, apesar de serem reconhecidamente não mutagênicos pela literatura (SHU et al., 1991; BURNS; GAUTHIER, 1984), deve ser avaliada quanto à sua toxicidade em testes de reconhecida confiabilidade.

4 CONCLUSÃO

O tratamento desenvolvido utilizando cepas de *L. bulgaricus* LB-UFSC 001 foi capaz de biodegradar os compostos mutagênicos formados durante o processamento da mortadela sob diferentes condições experimentais. A sensibilização do micro-organismo ocorreu a partir de uma concentração de aproximadamente $\pm 10 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada composto. A detecção dos principais metabólitos, e formulação de rotas reacionais demonstraram que LB-UFSC 001 utiliza-se de reações enzimáticas envolvendo nitroreduases e hidratases nitrílicas para modular as espécies químicas nocivas na matriz carnea. Todas as mortadelas produzidas durante o estudo apresentaram resultados positivos para os mutagênicos. No entanto, as mortadelas elaboradas com proporções de 0,3% de nitrito e 0,034% de sorbato, respectivamente, sem adição do antioxidante eritorbato de sódio apresentaram os maiores concentrações de ENA e DNMP. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) das concentrações de ENA e DNMP nas mortadelas

antes e após serem submetidas ao tratamento com LB-UFSC 001. O uso concomitante dos conservantes nitrito de sódio e sorbato de potássio em diferentes proporções submetido ao processamento térmico, demonstrou ser potencial fonte de formação de compostos tóxicos no processamento simulado de embutidos cozidos.

Incertezas experimentais e teóricas foram levantadas visando a confiabilidade dos resultados. Além disso, expuseram as principais limitações do estudo. Uma análise proteômica comparativa para a expressão diferencial de proteínas induzidas pela presença de DNMP e ENA em LB-UFSC 001 é necessária, elucidando as principais enzimas que atuam na biodegradação descrita neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALAHAKOON, A. et al. Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. *Trends in Food Science & Technology*, v. 45, n. 1, p. 37-49, 2015.
- BARTKIENE, E. et al. The impact of lactic acid bacteria with antimicrobial properties on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and biogenic amines in cold smoked pork sausages. *Food Control*, v. 71, p. 285-292, 2017.
- BASSAGANYA-RIERA, J. et al. Immunoregulatory Mechanisms Underlying Prevention of Colitis-Associated Colorectal Cancer by Probiotic Bacteria. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, p. e34676, 2012.
- BINSTOK, G. et al. Sorbate–nitrite reactions in meat products. *Food Research International*, v. 31, n. 8, p. 581-585, 1998.
- BURNS, J.; GAUTHIER, J. Prevention of Urinary Catheter Incrustations by Acetohydroxamic Acid. *Journal of Urology*, v. 132, n. 3, p. 455-456, 1984.
- DE MAERE, H. et al. Influence of meat source, pH and production time on zinc protoporphyrin IX formation as natural colouring agent in nitrite-free dry fermented sausages. *Meat Science*, v. 135, p. 46-53, 2018.
- DE DEA LINDNER, JULIANO. Characteristics and Production of Microbial Cultures. In: PENNA, ANA LUCIA BARRETTO, NERO, LUIS A. TODOROV, SVETOSLAV D. (Ed.). *Fermented Foods of Latin America: From Traditional Knowledge to Innovative Applications*. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2017, p. 279-306.
- DE OLIVEIRA, I.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. Nitroreductases: enzymes with environmental, biotechnological and clinical importance. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2. ed. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2010. p. 1008-1019.
- DELLA BETTA, F. et al. A sub-minute CZE method to determine nitrate and nitrite in meat products: An alternative for routine analysis. *Meat Science*, v. 119, p. 62-68, 2016.
- DOMINGO, J.; NADAL, M. Carcinogenicity of consumption of red meat and processed meat: A review of scientific news since the IARC decision. *Food and Chemical Toxicology*, v. 105, p. 256-261, 2017.
- EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives. *EFSA Journal* v. 13, n. 6, 2015.
- FENG, X. et al. Influence of sodium nitrite on protein oxidation and nitrosation of sausages subjected to processing and storage. *Meat Science*, v. 116, p. 260-267, 2016.

- GHASEMI, A.; JEDDI, S. Anti-obesity and anti-diabetic effects of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, v. 70, p. 9-24, 2017.
- HANSEN, T.; TANNENBAUM, S.; ARCHER, M. Identification of nonenylnitrolic acid in corn treated with nitrous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* v. 29, n. 5, p. 1008-1011, 1981.
- HARTMAN, P. Review: Putative mutagens and carcinogens in foods. II: Sorbate and sorbate-nitrite interactions. *Environmental Mutagenesis*, v. 5, n. 2, p. 217-222, 1983.
- HASKARD, C.; BINNION, C.; AHOKAS, J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*, v. 128, n. 1, p. 39-49, 2000.
- HERRAIZ, T.; GALISTEO, J. Nitrosative deamination of 2'-deoxyguanosine and DNA by nitrite, and antinitrosating activity of β -carboline alkaloids and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, v. 112, p. 282-289, 2018.
- HERRMANN, S. et al. Dietary exposure to volatile and non-volatile N-nitrosamines from processed meat products in Denmark. *Food and Chemical Toxicology*, v. 80, p. 137-143, 2015.
- HERRMANN, S.; GRANBY, K.; DUEDAHL-OLESEN, L. Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages. *Food Chemistry*, v. 174, p. 516-526, 2015.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). *Monographs Evaluate Consumption of Red Meat and Processed Meat*. Vol. 114, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Lyon, France: Who Press, 2015. 511p. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono114.pdf>>. Acesso em 09 nov. 2018.
- KADA, T. DNA-damaging products from reaction between sodium nitrite and sorbic acid. *Annu. Rep. Nat. Inst. Genet*, 1974.v. 24, p. 43-44, 1974.
- KANO, H. et al. Oral administration of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* OLL1073R-1 suppresses inflammation by decreasing interleukin-6 responses in a murine model of atopic dermatitis. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 6, p. 3525-3534, 2013.
- KITO, Y.; NAMIKI, M.; TSUJI, K. A new n-nitropyrrole: 1,4-Dinitro-2-methylpyrrole, formed by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite. *Tetrahedron*, v. 34, n. 5, p. 505-508, 1978.
- KOBORI, TOSHIRO et al. Structure and site-directed mutagenesis of a flavoprotein from *Escherichia coli* that reduces nitrocompounds: alteration of pyridine nucleotide binding by a single amino acid substitution. *Journal of Biological Chemistry* v. 276, n. 4, p. 2816-2823, 2000.

- MOLOGNONI, L. et al. A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. *Talanta*, v. 178, p. 1053-1066, 2018a.
- MOLOGNONI, L. et al. Development of a new analytical tool for assessing the mutagen 2-methyl-1,4-dinitro-pyrrole in meat products by LC-ESI-MS/MS. *Talanta*, v. 185, p. 151-159, 2018b.
- MOTTRAM, D. et al. Influence of ascorbic acid and pH on the formation of N-nitrosodimethylamine in cured pork containing added dimethylamine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 26, n. 1, p. 47-53, 1975.
- NAGAI, T. et al. Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice. *International Immunopharmacology*, v. 11, n. 12, p. 2246-2250, 2011.
- NAMIKI, M.; KADA, T. Formation of ethylnitrolic acid by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 39, n. 6, p. 1335-1336, 1975.
- NAMIKI, M. et al. Chemical aspects of mutagen formation by sorbic acid-sodium nitrite reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 29, n. 2, p. 407-411, 1981.
- NAMIKI, M. et al. Formation of mutagens by sorbic acid-nitrite reaction: effects of reaction conditions on biological activities. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 73, n. 1, p. 21-28, 1980.
- OSAWA, T. et al. Desmutagenic actions of ascorbic acid and cysteine on a new pyrrole mutagen formed by the reaction between food additives; Sorbic acid and sodium nitrite. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 95, n. 2, p. 835-841, 1980.
- OSAWA, T. et al. Desmutagenic action of food components on mutagens formed by the sorbic acid/nitrite reaction. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 50, n. 8, p. 1971-1977, 1986.
- PÉREZ-PRIOR, M. et al. Reactivity of the Mutagen 1, 4-Dinitro-2-methylpyrrole as an Alkylating Agent. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 75, n. 5, p. 1444-1449, 2010.
- PÉREZ-PRIOR, M. et al. Solvent effects in the decomposition reaction of some products formed by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite: 1, 4-dinitro-2-methylpyrrole and ethylnitrolic acid. *Journal of Physical Organic Chemistry*, v. 22, n. 5, p. 418-424, 2009.
- PETERSON, F. et al. Oxygen-sensitive and-insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 254, n. 4, p. 4009-4014, 1979.

SELLIMI, S. et al. Enhancing colour and oxidative stabilities of reduced-nitrite turkey meat sausages during refrigerated storage using fucoxanthin purified from the Tunisian seaweed *Cystoseira barbata*. *Food and Chemical Toxicology*, v. 107, p. 620-629, 2017.

SHU, Y. et al. Metabolism of 1,4-dinitro-2-methylpyrrole, a mutagen formed by a sorbic acid-nitrite reaction, by intestinal bacteria. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 17, n. 3, p. 181-187, 1991.

SINDELAR, J.; MILKOWSKI, A. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide*, v. 26, n. 4, p. 259-266, 2012.

SOFOS, J.; BUSTA, F.; ALLEN, C. Botulism Control by Nitrite and Sorbate in Cured Meats: A Review. *Journal of Food Protection* v. 42, n. 9, p. 739-770, 1979.

SOFOS, J. Improved Cooking Yields of Meat Batters Formulated with Potassium Sorbate and Reduced Levels of NaCl. *Journal of Food Science* v. 50, n. 6, p. 1571-1575, 1985.

WÓJCIAK, K.; KARWOWSKA, M.; DOLATOWSKI, Z. Use of acid whey and mustard seed to replace nitrites during cooked sausage production. *Meat Science*, v. 96, n. 2, p. 750-756, 2014.

ZAMORA, M.; ZARITZKY, N. Potassium Sorbate Inhibition of Microorganisms Growing on Refrigerated Packaged Beef. *Journal of Food Science*, v. 52, n. 2, p. 257-262, 1987.

CAPÍTULO V - INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO EM ABORDAGENS EXPERIMENTAIS PARA ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO EM ANÁLISES DE CONSERVANTES EM ALIMENTOS.

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Em 1916, após a comprovação de alguns teoremas Albert Einstein publicou a teoria da relatividade geral. Entre eles, o encurvamento de um satélite natural em ângulo específico ($\alpha = 1,8^\circ$) ao passar próximo ao sol. Na prática, o cientista precisou realizar diversas medições e deixar os resultados decidirem entre as teorias rivais. Entretanto, medir algo assim não foi tarefa fácil, uma vez que medidas complexas podem apresentar grandes desafios e elevadas incertezas. A teoria foi comprovada após a realização de medidas durante um eclipse solar, fenômeno que conferiu menor incerteza da medida e consequentemente a aceitação do resultado.

Em um contexto mais atual, e também importante, este capítulo descreve a importância das medições para diversas áreas da ciência, que utilizam de medidas realizadas em laboratórios para obter universalidade, comparabilidade e confiabilidade de novas hipóteses e teorias. Como exemplo, a modernização dos instrumentos de medidas aplicados à Ciência dos Alimentos, vem proporcionando novas descobertas e a capacidade da melhoria contínua dos dados empíricos herdados. Entretanto, a complexidade das matrizes alimentares e os processos de medição químicos podem comprometer a qualidade dos resultados e de seus propósitos.

Utilizando-se de dados brutos gerados durante a construção desta tese, foi possível demonstrar os diferentes perfis de incertezas de métodos de conservantes em alimentos, de acordo com complexidade da matriz, parâmetros de desempenho comumente aplicados e abordagens de cálculo. A importância e relevância do assunto aplicado à Química dos Alimentos e para a confiabilidade desta tese, foi reconhecida com a publicação do capítulo no periódico *Food Chemistry*.

Artigo publicado:

MOLOGNONI, L. et al. Influence of method validation parameters in the measurement uncertainty estimation by experimental approaches in food preservatives analysis. *Food Chemistry*, v. 282, p. 147-152, 2019.

RESUMO

A estatística de incertezas aleatórias foi adotada para a estimativa da incerteza de medição química, uma vez que é um bom estimador da incerteza geral. As incertezas do tipo B (herdadas) são geralmente insignificantes quando comparadas às incertezas do tipo A (experimentais). Em medidas quantitativas, a média é o valor mais provável do mensurando e o desvio padrão da média como a melhor estimativa de sua incerteza. A incerteza de medição de medidas qualitativas pode ser estimada pela probabilidade de tomar decisões certas ou erradas. Assim, os dados de desempenho dos métodos analíticos são a principal fonte de estimativa de incertezas. No entanto, incertezas obtidas através de um baixo número de observações devem ser vistas com cautela a ser utilizado para representar a incerteza global. Este estudo demonstrou a influência que as incertezas randômicas obtidas através de abordagens experimentais de estimativas têm sobre ensaios químicos. Os diferentes perfis de incerteza foram demonstrados dependendo da técnica analítica e da composição dos alimentos.

Palavras chave: Análise de alimentos. Composição dos alimentos. Confiabilidade de medição. Conservantes. Métodos qualitativos. Sulfito.

ABSTRACT

The statistical method of random uncertainties has been adopted for the uncertainty calculation of chemical measurements, since it is a good estimator of the overall uncertainty. Type B (inherited) uncertainties are usually insignificant when compared to type A (experimental) uncertainties. In quantitative measures, the mean is the most probable value of the measurand and the standard deviation of the mean is the best estimate of its standard uncertainty. Measurement uncertainty of qualitative measures may be estimated by the probability of taking right or wrong decisions. Thus, performance data of analytical methods are the main source of uncertainties. However, uncertainties obtained from limited observations should be used with caution to represent the overall uncertainty. This study demonstrated the influence of random uncertainties on the results of experimental approaches to estimate the uncertainty in chemical assays. The different profiles of uncertainty were demonstrated depending on the analytical technique and food composition.

Keywords: Food analysis. Food composition. Measurement reliability. Preservatives. Qualitative methods. Sulfite.

1 INTRODUÇÃO

O resultado de uma medição é somente uma estimativa de uma quantidade específica do mensurando ou de sua probabilidade de acerto. Uma medida só se torna completa quando acompanhada de sua incerteza de medição (IM). A IM reflete a qualidade do procedimento analítico e auxilia na interpretação dos resultados, já que as decisões importantes necessitam ser tomadas (TAYLOR, 2009; ROZET et al., 2011; MOLOGNONI et al., 2017). Nesse sentido, a norma internacional ISO/IEC 17025:2017 preconiza que os laboratórios inseridos em um sistema de gestão de qualidade devem avaliar a IM de todos os métodos que compõem seu escopo (ISO, 2017). Por outro lado, as medidas realizadas em laboratórios de análises químicas empregam diversas abordagens de expressão do resultado (qualitativa e quantitativa), técnicas analíticas, métodos de medição, modelos de cálculos, e conseqüentemente, diferentes abordagens de estimativa de IM.

A abordagem *GUM* foi uma proposta da Metrologia Dimensional para padronizar os cálculos de estimativa das incertezas. Também conhecida como modelagem matemática, cada fonte de incerteza é quantificada individualmente e seus efeitos são então combinados utilizando uma expansão da série de Taylor, geralmente de primeira ordem (ISO, 2008). Desde os anos 90, tem sido demonstrado que a abordagem *GUM* pode ser utilizada com sucesso para o cálculo da IM em medições químicas (ELLISON, 2014). Entretanto, geralmente é adotada a abordagem experimental em medições químicas, baseadas em análise estatística de incertezas aleatórias. Por essa abordagem, não há necessidade de estudar e quantificar cada componente de incerteza individualmente, o que simplifica o processo de estimativa de uma incerteza global. Dessa forma, dados de desempenho de métodos analíticos obtidos em avaliações intralaboratoriais são as principais fontes de incertezas utilizadas (EUROLAB, 2007; MOLOGNONI et al., 2016).

Em medidas químicas quantitativas, utiliza-se a média como o valor mais provável do mensurando (analito) e o desvio padrão da média como a sua melhor estimativa de sua incerteza. Por outro lado, em medidas químicas qualitativas, a IM não pode ser expressa dessa forma, isto é, como um parâmetro que caracteriza a dispersão dos resultados. A forma típica de estimar a IM de um resultado qualitativo é através da probabilidade de tomar uma decisão certa ou errada. Diferentes abordagens de cálculo de probabilidade têm sido desenvolvidos e relatados na literatura especializada (PULIDO et al., 2003; SONG et al., 2001).

As incertezas obtidas experimentalmente parecem ser um bom estimador da incerteza global das medições químicas, já que as incertezas do tipo B (herdadas) geralmente são insignificantes quando comparadas às incertezas experimentais obtidas por meio de equipamentos e analistas (ISO, 2008). No entanto, a utilização de incertezas experimentais obtidas através de um número limitado de observações para representar uma incerteza global deve ser vista com cautela. Os resultados podem não ser realísticos, já que em alguns casos pode não simular de forma adequada o procedimento analítico em rotina laboratorial (MOLOGNONI et al., 2018).

O sulfito de sódio (INS 221) é aprovado mundialmente como aditivo alimentar no processamento de diversos alimentos, respeitando-se as condições específicas do uso. No Brasil, o sulfito de sódio é usado como conservante em camarões e lagostas, adicionando-se o sal à matéria-prima, logo após a captura. É também amplamente utilizado na fabricação de conservas vegetais, sucos, bebidas e geleias de frutas (BRASIL, 1981). O sulfito é também considerado um potencial alergênico alimentar e vem sendo relacionado a alguns sintomas de intolerância alimentar, como o broncoespasmo (RUIZ-CAPILLAS; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2009). Dessa forma, o controle do uso de sulfito é uma das determinações de rotina de maior relevância em análise de alimentos.

Nesse contexto, este estudo teve por objetivo demonstrar a influência que as incertezas aleatórias obtidas em procedimentos de confirmação de desempenho de métodos analíticos, têm nas abordagens experimentais de estimativa de IM de ensaios químicos. Para isso, foi utilizado métodos quantitativos e qualitativos para análise de sulfito em carnes, pescados e derivados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras, reagentes e padrões

Foram utilizadas amostras de carne *in natura* (suína, bovina e de frango), pescados (peixe e camarão) e produtos cárneos (embutidos cozidos e *cornedbeef*). Todas as amostras foram processadas utilizando um processador de alimentos e estocadas a 4 ± 2 °C em sacos plásticos até o momento das análises.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Verde de malaquita foi fornecido por Sigma-Aldrich Co. (EUA). Toda a água utilizada foi purificada pelo sistema Milli-Q (França). Materiais de referência de hidroximetilsulfonato de sódio,

sulfito de sódio e hidrogenoftalato de potássio com pureza mínima de 98% foram fornecidos por Sigma-Aldrich Co. (EUA). Solução de verde malaquita a 0,25% (m/v) foi preparada em água e estocada em frasco âmbar.

2.2 Procedimentos analíticos

Foram avaliados dois métodos analíticos neste trabalho. O primeiro consistiu na determinação quantitativa de sulfito por acidimetria de acordo com método 990,28 da AOAC (AOAC, 2015). Para isso, a amostra é aquecida em meio ácido (ácido clorídrico 6 mol L^{-1}), para que o sulfito seja convertido em dióxido de enxofre (SO_2). Um fluxo de nitrogênio arrasta o SO_2 até uma solução receptora de peróxido de hidrogênio a 3%, onde o analito é oxidado a ácido sulfúrico e determinado indiretamente com solução padronizada de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para isso, foi utilizada a bureta digital automática Titronic Universal Schott Instruments GmbH (Alemanhã), com resolução infinita de 0,005 mL, incerteza expandida ($k = 2,0$) e erro máximo no volume de trabalho de 0,001 mL e 0,01 mL, respectivamente.

A determinação qualitativa de sulfito de sódio foi realizada de acordo com o método oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1981). A amostra (10 g) foi solubilizada em água morna (30 mL) e aquecida em banho-maria por uma hora, sob agitação. Todo o conteúdo foi filtrado e uma alíquota de 5 mL foi transferida para tubo de ensaio, que foi adicionado de 5 mL da solução de verde malaquita. O resultado foi considerado positivo se ocorresse a descoloração da solução de verde malaquita, em comparação a uma prova em branco, que mantém a cor original.

Em ambos os processos de medição, foi utilizada uma balança analítica de resolução infinita de 0,00005 g, incerteza expandida ($k = 2,0$) e erro máximo na faixa de trabalho de 0,002 mL e 0,009 mL, respectivamente.

2.3 Confirmação de desempenho dos métodos analíticos

2.3.1 Método quantitativo

A precisão em termos de repetitividade foi avaliada em setuplicata utilizando amostra de camarão. Foram calculadas a média, desvio padrão da média, coeficiente de variação (CV%) e parâmetro obtido através da equação de *Horwitz*. O valor do CV% foi

considerado aceitável se fosse inferior ao obtido pela equação de *Horwitz*. A precisão intermediária foi avaliada realizando-se análises em triplicata sob condições variadas de medição: diferentes dias ($n = 3$) e instrumentos (buretas, $n = 3$). O CV% foi considerado aceitável se igual ou inferior a 10%. Já a exatidão em termos de recuperação foi avaliada através da fortificação no limite regulatório de 100 mg kg^{-1} . Essa fortificação foi realizada com padrões de sulfito tanto em solvente como em diferentes matrizes brancas de camarão, peixe e *cornedbeef*, nas mesmas condições experimentais da precisão intermediária. As recuperações foram consideradas aceitáveis se estivessem entre 80-110%.

2.3.2 Método qualitativo

Para a confirmação de desempenho do método qualitativo, primeiramente o limite de detecção (LoD) foi avaliado, adicionando-se quantidades crescentes de sulfito (10, 25, 50, 75, 100 e 150 mg kg^{-1}) até a obtenção de um teste positivo com precisão aceitável. Para determinar a seletividade no nível de ação (LoD), diferentes amostras brancas foram fortificadas em triplicata. Também foram adicionados possíveis interferentes como íons cloretos, fosfatos, nitratos, nitritos, oxalatos e sulfetos para observar a potencial descoloração do reagente. A confirmação final da especificidade foi realizada comparando-se os resultados obtidos com os executados pelo método quantitativo. Por fim, a precisão do método foi avaliada em duas rodadas, aplicando variáveis de medição como dias ($n = 2$) e analistas ($n = 2$). As amostras foram fortificadas e identificadas com números aleatórios e submetidas em análises as cegas pelos analistas. O critério de aceitabilidade foi a concordância de 100% dos resultados das réplicas em termos de repetitividade e precisão intermediária.

2.4 Estimativa da incerteza de medição

O cálculo da estimativa da IM deste estudo utilizou apenas incertezas experimentais provenientes de dados randômicos. Dessa forma, os dados brutos foram tratados a fim de evitar erros grosseiros e erros sistemáticos. Teste de Dixon (95%) foi empregado para eliminar valores aberrantes e gráfico de dispersão foi utilizado para verificar a tendência dos dados utilizando Excel versão 2010. A IM do ensaio quantitativo

foi determinada considerando as incertezas padrão referente a precisão e bias. O cálculo foi de acordo com a equação 1.

$$u(x_i) = \frac{\sigma_{\bar{x}_i}}{\sqrt{n}} \quad (1)$$

Onde $u(x_i)$: incerteza padrão de entrada; $\sigma_{\bar{x}_i}$: desvio padrão da média de n dados aleatórios com 95% de probabilidade de acerto considerando distribuição t-Student.

A incerteza padrão combinada foi obtida através da propagação das incertezas padrão de saída (68% probabilidade), de acordo com a equação 2.

$$u_c^2(SO_2) = (u(\text{Rep}))^2 + (u(\text{repro}))^2 + (u(b))^2 \quad (2)$$

Onde $u_c^2(SO_2)$: incerteza padrão combinada obtidas através da abordagem de validação intralaboratorial (mg kg^{-1}); $u(\text{Rep})$: incerteza padrão da repetitividade (mg kg^{-1}); $u(\text{repro})$: incerteza padrão da precisão intermediária (mg kg^{-1}); $u(b)$: incerteza padrão bias (mg kg^{-1}) e $\frac{\partial SO_2}{\partial x_i}$: coeficientes de sensibilidade = 1.

Por fim, foi calculada a incerteza padrão expandida (95%) de acordo com a equação 3.

$$U(SO_2) = k \cdot u_c(SO_2) \quad (3)$$

Onde $U(SO_2)$: incerteza padrão expandida do mensurando SO_2 ; $u_c(SO_2)$: incerteza padrão combinada do mensurando SO_2 e k : coeficiente de abrangência com 95% de probabilidade de acerto considerando a distribuição t-Student.

Por outro lado, as incertezas herdadas também foram avaliadas. Esse procedimento visou comparar a ordem de grandeza desse tipo de incerteza frente às incertezas experimentais. Para isso, foi utilizada a modelagem matemática de acordo com as equações 4, 5 e 6.

$$SO_2(mgkg^{-1}) = \frac{V \cdot \left(\frac{m_s}{V_{Cf} \cdot C' \cdot M} \right) \cdot C}{m_c} \quad (4)$$

Onde V volume gasto da solução titulante na amostra (mL); C: constante de conversão molar; m_c : massa da amostra (g); m_s : massa do padrão de referência (g); $\left(\frac{m_s}{V_{Cf} \cdot C' \cdot M} \right)$: função referente a correção da concentração da solução titulante (mol L^{-1}); V_{cf} : volume gasto no padronização da solução titulante (mL); C' : constante de conversão molar e M: molaridade da solução titulante (mol/L).

$$\begin{aligned} u_c(C_f(m_s, V_{Cf}, M)) &= \left(\frac{\partial C_f}{\partial m_s} \right)^2 \cdot u(m_s)^2 + \left(\frac{\partial C_f}{\partial V_{Cf}} \right)^2 \cdot u(V_{Cf})^2 \\ &+ \left(\frac{\partial C_f}{\partial M} \right)^2 \cdot u(M)^2 \end{aligned} \quad (5)$$

Onde $u_c(C_f)$: incerteza padrão combinada referente ao fator de correção da solução titulante (mol L^{-1}); m_s : pesagem do padrão (g); V_{cf} : volume gasto na fatoração (mL); M: molaridade da solução (mol L^{-1}); $u(x_i)$: incerteza padrão de saída e $\frac{\partial C_f}{\partial x_i}$: coeficiente de sensibilidade.

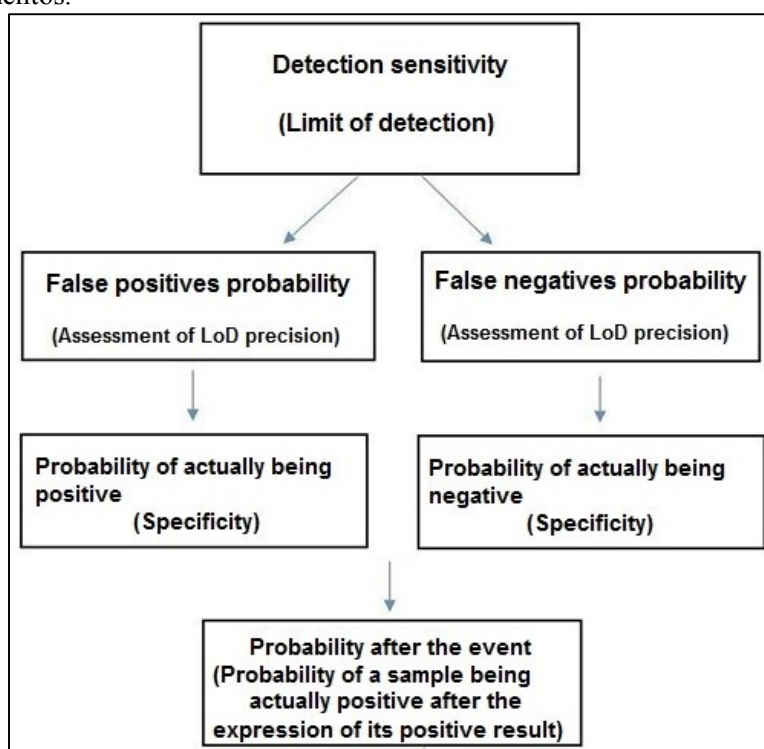
$$\begin{aligned} U(SO_2) &= \left\{ u_c^2(SO_2) \right. \\ &= \left(\frac{\partial SO_2}{\partial V} \right)^2 \cdot u(V)^2 + \left(\frac{\partial SO_2}{\partial m_c} \right)^2 \cdot (um_c)^2 \\ &+ \left(\frac{\partial SO_2}{\partial C_f} \right)^2 \cdot u(C_f)^2 \\ &\left. + 2 \cdot \left(\frac{\partial SO_2}{\partial C_f} \right) \cdot u(C_f) \cdot \left(\frac{\partial SO_2}{\partial V} \right) \cdot (\sigma V) \cdot r_{cf, v} \right\} \cdot k \end{aligned} \quad (6)$$

Onde $U(SO_2)$: incerteza padrão expandida do mensurando (mg kg^{-1}); u_c : incerteza padrão combinada (mg kg^{-1}); V, m e fc , : variáveis de medição do modelo global em unidades de

mL, g, mol L⁻¹, respectivamente; $u(x_i)$: incerteza padrão de saída; $\frac{\partial f}{\partial x_i}, \frac{\partial f}{\partial x_j}$: coeficientes de sensibilidade e r_{ij} : coeficiente de correlação estimado.

A IM do ensaio qualitativo foi determinada considerando os dados da avaliação da precisão. Seletividade e limite de detecção do método foram obtidos através da fortificação com o analito. Para isso, foi utilizado o teorema de *Bayes*, visando descobrir a probabilidade de determinados acontecimentos decorrentes a outros, de acordo com o esquema da figura 1 e equação 7, respectivamente.

Figura 1– Design experimental para estimativa da incerteza de medição do ensaio qualitativo de sulfito em alimentos.



Fonte: Molognoni et al. (2019).

$$P(A|B) = \frac{P(A)P(B|A)}{P(A)P(B|A) + P(A^c)P(B|A^c)} \quad (7)$$

Onde $P(A)$: probabilidade do resultado ser positivo; $P(A^c)$: probabilidade complementar do resultado não ser positivo; $P(B|A)$: probabilidade condicional do resultado ser positivo e o analista de fato ter a comprovação de que é positivo; $P(B|A^c)$: probabilidade condicional do resultado ser positivo e o analista comprovar que não é positivo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desempenho do método quantitativo para SO₂ foi satisfatório (Tabela 1). O valor de CV% da repetitividade foi inferior ao valor determinado pela equação de Horwitz. Já na precisão em condições de precisão intermediária, o CV% foi em torno de 6%. Esses valores demonstram precisão aceitável do método. A exatidão em termos de recuperação de SO₂ em solvente apresentou resultados entre 80 e 110%. Por outro lado, as recuperações em matriz branca fortificada apresentaram baixos perfis de recuperação. A AOAC Internacional recomenda que a recuperação nesse procedimento analítico seja preferencialmente avaliada com o hidroximetilsulfonato (HMSO), devido à sua maior estabilidade frente a outros padrões de sulfito (AOAC, 2015). Considerando matrizes complexas como os alimentos e os padrões utilizados (metabissulfito e sulfito de sódio) não serem os mais adequados, as recuperações foram consideradas aceitáveis em torno de 74%. Ao utilizar o HMSO, a recuperação ficou em torno de 90%. No entanto, foram considerados no estudo os dados obtidos utilizando metabissulfito de sódio, porque essa espécie é a mais representativa na rotina analítica. Sulfito e metabissulfito de sódio são adicionados pela indústria como conservantes, sem que haja um aditivo com formaldeído inserido, como no HMSO. Diversos trabalhos relatam o baixo desempenho do método de Monier-Williams ao compara-lo a técnicas mais seletivas como LC-MS. Entre os principais relatos estão a baixa especificidade do analito em amostras vegetais, baixas recuperações e limitada reprodutibilidade (ROBBINS et al., 2015; ROBBINS CARLOS; DE JAGER, 2016).

Tabela 1– Resultados dos parâmetros de validação do método quantitativo de sulfito em alimentos por volumetria

Repetitividade CV (%) < Horwitz (%)	Precisão intermediária (CV%)	^a Taxa de recuperação (em solvente, %)	^a Taxa de recuperação (em matriz, %)
5,30 < 15,6	6,10	82,5	73,7

CV = coeficiente de variação. ^aRecuperação obtida utilizando metabissulfito de sódio.

Fonte: Molognoni et al. (2019).

No ensaio qualitativo, a descoloração da solução de verde malaquita foi observada a partir de 75 mg kg⁻¹. Esse LoD apresentou reprodutibilidade e seletividade de resposta nas diferentes matrizes e interferentes estudados. Entretanto, em peixes, produtos de salsicharia e na presença de sulfeto de sódio, o verde malaquita não descoloriu utilizando

esse LoD adotado. Por outro lado, após o aumento do LOD para 100 mgkg^{-1} , o teste obteve todos os resultados positivos, demonstrando ser seletivo.

Os resultados referentes à precisão do método foram satisfatórios (Tabela 2). O número 1 indica a presença de sulfito constatado pelo analista e 0 a ausência. Em métodos qualitativos, muitas vezes a resposta binária depende somente da acuidade visual do analista, o que representa uma fonte inesgotável de erros aleatórios. Entretanto, a avaliação da precisão não é tão recorrente como observado em métodos quantitativos, porque métodos qualitativos não são associados a números e, conseqüentemente, a testes estatísticos. Foram obtidos 100% de concordância entre os resultados qualitativos, tanto em condições de repetitividade quanto em condições de precisão intermediária.

Tabela 2– Resultados da avaliação de precisão do método de sulfito qualitativo por reação de verde malaquita.

	Amostras	Resultado esperado	Resultado (Analista 1)	Resultado (Analista 2)	Amplitude	Confirmação do resultado
DIA 1	755	0	0	0	0	0
	800	1	1	1	0	1
	859	0	0	0	0	0
	507	1	1	1	0	1
	417	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0
	969	0	0	0	0	0
	Taxa de concordância (%)					100%
	Amostras	Resultado esperado	Resultado (Analista 1)	Resultado (Analista 2)	Amplitude	Confirmação do resultado
DIA 2	675	0	0	0	0	0
	375	0	0	0	0	0
	022	1	1	1	0	1
	306	0	0	0	0	0
	078	0	0	0	0	0
	141	0	0	0	0	0
	402	0	0	0	0	0
	Taxa de concordância (%)					100%

Fonte: Molognoni et al. 2019.

A aleatoriedade dos dados quantitativos gerados foi comprovada, já que não foram constatados valores aberrantes e os dados se apresentaram graficamente dispersos. Dessa forma, as incertezas provenientes de erros grosseiros e ou sistemáticos não foram consideradas na incerteza global, uma vez que não podem ser diminuídos com o aumento do número de medidas na rotina analítica. A maior fonte de incertezas do método quantitativo foi do tipo A (experimental), referente à precisão em termos de precisão

intermediária (Tabela 3). Isso é compreensível, uma vez que esse parâmetro atribui variáveis de medição que propagam erros aleatórios provenientes de escalas de instrumentos e analistas. Apesar das baixas recuperações, a incerteza referente a *bias* foi menor que a de precisão, uma vez que a taxa de recuperação é estável e reproduzível, mesmo sendo abaixo do recomendado. Já as incertezas do tipo B (herdadas) foram desprezíveis em relação às incertezas de erros randômicos gerados em avaliações de precisão e recuperação, empregando um número limitado de medidas. A maior contribuição foi referente ao fator de correção da solução titulante. Essa incerteza propaga as incertezas referentes a processos volumétricos e pesagens. Entretanto, todos os valores das incertezas padrão de saída foram inferiores às incertezas padrão experimentais. Isso pode ser verificado comparando-se as incertezas padrão combinadas nas duas abordagens de estimativa de incertezas (Tabela 3). Dessa forma, parâmetros de desempenho de métodos analíticos quantitativos demonstram ser dados empíricos importantes e representativos para expressar uma incerteza global. Na literatura, existem diversas abordagens para estimar uma incerteza global através de parâmetros de desempenho intralaboratorial como precisão, *bias*, robustez, capacidade de detecção (CC_{β}), limite de decisão (CC_{α}), entre outros. Dados obtidos em avaliação interlaboratoriais em ensaios colaborativos também podem ser empregados (MOLOGNONI et al., 2016; MOLOGNONI et al., 2017).

Tabela 3 – Resultados das incertezas de medição do método quantitativo de sulfito através de diferentes abordagens de estimativa.

Fontes de incerteza padrão tipo B (herdadas)										
Tipo	Fonte	Valor	Divisor	$u(x_i)$	Unidade de entrada	Distribuição	C_i	$u(y_i)$	Unidade de saída	V_{eff}
B	Pesagem $u(m_c)$	0,0010	2,00	0,0005	g	Normal	-280,82	0,14	mg kg^{-1}	∞
B	Volume $u(V)$	0,0019	2,00	0,0010	mL	Normal	200,58	0,19	mg kg^{-1}	∞
B	Fator de correção $u(V_{\text{cf}})$	0,0187	2,00	0,0094	mol L^{-1}	t-Student	30,16	0,28	mg kg^{-1}	∞
Incerteza padrão combinada = $0,37 \text{ mg kg}^{-1}$										
Incerteza padrão expandida ($k = 2,00$) = 1 mg kg^{-1}										
Fontes de incerteza padrão tipo A (experimentais)										
Tipo	Fonte	Valor	Divisor	$u(x_i)$	Unidade de entrada	Distribuição	C_i	$u(y_i)$	Unidade de saída	V_{eff}
A	Repetitividade $u(\text{Rep})$	5,3	2,52	2,1032	mg kg^{-1}	t-Student	1,00	2,10	mg kg^{-1}	6
A	Precisão intermediária $u(\text{IP})$	6,1	2,23	2,7354	mg kg^{-1}	t-Student	1,00	2,74	mg kg^{-1}	12
A	Recuperação (bias) $u(b)$	3,33	2,23	1,4933	mg kg^{-1}	t-Student	1,00	1,49	mg kg^{-1}	12
Incerteza padrão combinada = $3,76 \text{ mg kg}^{-1}$										
Incerteza padrão expandida ($k = 2,13$) = 8 mg kg^{-1}										

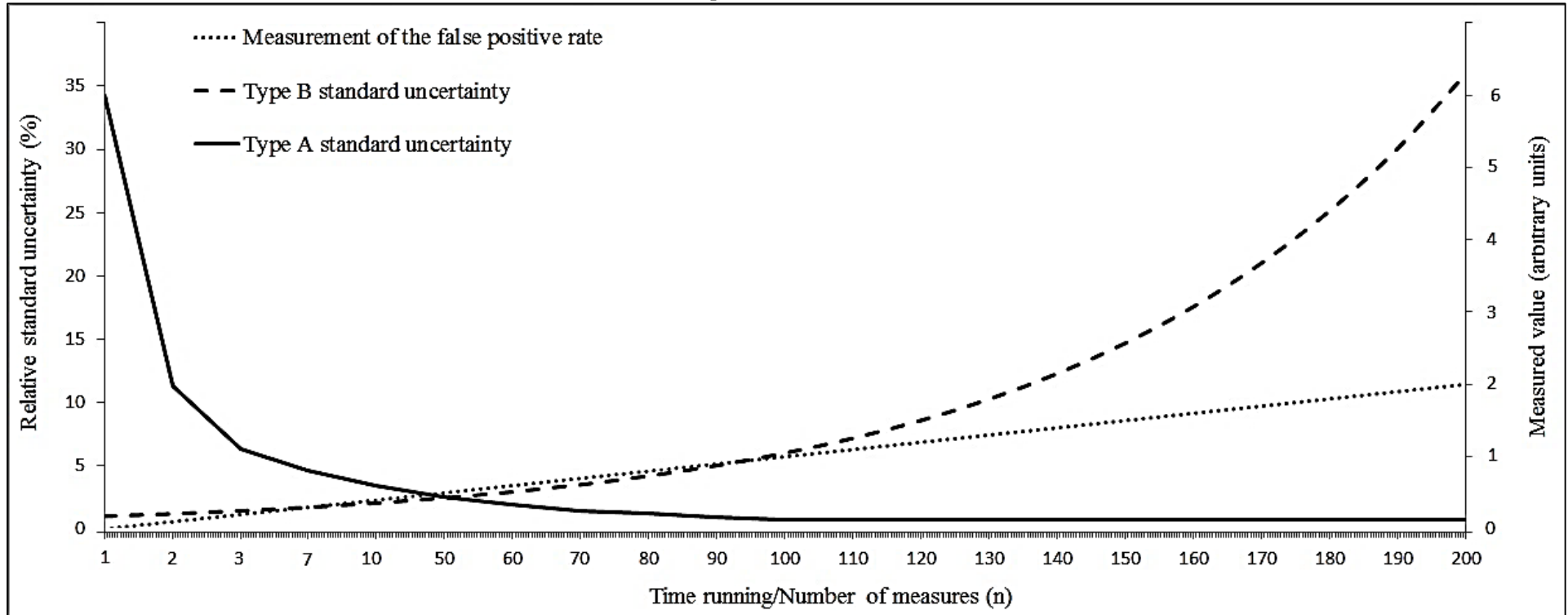
$u(x_i)$ incerteza padrão de entrada; $u(y_i)$ = incerteza padrão de saída; C_i = coeficiente de sensibilidade.

Fonte: Molognoni et al. (2019).

A incerteza de medição do ensaio qualitativo foi determinada utilizando o teorema de *Bayes* com sucesso. Entretanto, não foi possível modificar a estimativa da probabilidade do evento (taxa de falsos positivos) quando uma evidência adicional ao evento (confirmação do resultado através da seletividade) estava disponível. Isso porque foram obtidos 100% de concordância entre os resultados (0% taxa de falsos negativos) e todos os resultados do teste foram confirmados através de um método seletivo. Dessa forma, os resultados qualitativos de sulfito tiveram probabilidade de 100% de acerto e 0% de relatar um resultado falso positivo.

Os procedimentos de validação de métodos analíticos devem simular a real rotina que os analitos são submetidos em condições de medição (MOLOGNONI et al., 2018). Entretanto, simular a precisão do método em longo prazo torna-se difícil, considerando o espaço amostral geralmente utilizado nesses experimentos. Por outro lado, a seletividade pode comprometer a confiabilidade dos resultados quando novas amostras são medidas, o que parece ser um fato corriqueiro em rotina de laboratórios de controle de alimentos. Considerando a diversidade e complexidade das matrizes alimentares e o espaço amostral das medidas, conclui-se que as diferentes fontes de incertezas (tipo A, tipo B e probabilidades de acerto de ensaios qualitativos) possuem perfis diferentes. As incertezas do tipo A de ensaios quantitativos inicialmente tendem a ser superestimadas (figura 2). Entretanto, ao longo do tempo e com o aumento do número de graus de liberdade durante a rotina analítica, as fontes aleatórias de incerteza tendem a diminuir. Isso ocorre porque o fator \sqrt{n} da equação 1, cresce lentamente à medida que aumentamos o número de medidas n . Na prática, precisamos de um grande número de medições para diminuirmos a incerteza padrão experimental proveniente do desvio padrão da média. Por outro lado, isso ocorrerá naturalmente em um laboratório de controle com um número grande de amostras por ano, se o método de medição estiver adequadamente implementado e seus analistas altamente capacitados. Ao contrário do perfil das incertezas do tipo A, as incertezas do tipo B tendem a aumentar com o passar do tempo. Isso porque procedimentos analíticos adicionais podem ser inseridos na rotina após os trabalhos de confirmação de seu desempenho. A diluição de amostras com elevada concentração do analito e mudanças das faixas nominais dos instrumentos são inevitáveis ao longo da rotina. Nesse caso, as incertezas se repetem muitas vezes e se propagam até atingirem uma ordem de grandeza igual ou maior que os desvios experimentais, por sua vez, diminuem com o aumento do mensurando (MOLOGNONI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2016).

Figura 2 – Gráfico teórico dos diferentes perfis de incertezas obtidos a partir de medidas químicas laboratoriais, desde suas avaliações de desempenho inicial até infinitos números de medidas em rotina laboratorial sob condições de precisão intermediária.



Fonte: Molognoni et al. (2019).

Por outro lado, as incertezas de ensaios qualitativos podem ser inicialmente subestimadas. Os procedimentos de confirmação de desempenho não conseguem simular a diversidade das matrizes encaminhadas ao laboratório em longo prazo e manter a imparcialidade dos analistas. Nesse caso, novas matrizes requerem novas avaliações de seletividade no limite de ação estabelecido para o método. Muitas vezes, essas avaliações são negligenciadas quando o método já está implementado na rotina analítica, utilizando apenas dados empíricos obtidos anteriormente por semelhança das amostras. Dessa forma, a incerteza tende a aumentar ao longo do tempo, já que novas probabilidades de acerto são geradas, fornecendo diferentes taxas de falsos positivos.

4 CONCLUSÃO

As incertezas de natureza randômica obtidas através de experimentos de confirmação de desempenho de métodos analíticos são boas fontes para estimar uma incerteza global. Entretanto, são apenas o início para representar uma IM teórica. Essas incertezas devem estar sempre atualizadas conforme o desempenho do método em rotina analítica, conforme a composição da amostra, natureza da medida e analistas de alimentos para conferir maior confiabilidade dos resultados.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Method 990.28. Official Methods of Analysis 19ed. Arlington, ch.9, p.2, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Portaria nº 01, de 07 de outubro de 1981. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. Brasília: Ministério da Agricultura, 1981.
- ELLISON, S. Implementing measurement uncertainty for analytical chemistry: the Eurachem Guide for measurement uncertainty. *Metrologia*, v. 51, n. 4, p. 199-205, 2014.
- EUROPEAN FEDERATION OF NATIONAL ASSOCIATIONS OF MEASUREMENT, TESTING AND ANALYTICAL LABORATORIES (EUROLAB). Technical Report No. 1/2007: Measurement Uncertainty Revisited: Alternative Approaches to Uncertainty Evaluation, Paris, 2007.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). *Standard ISO/IEC 17025:2017*: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Genève, 2017.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). *GUIDE 98-3:2008*: Uncertainty of Measurement - Part 3: Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM: 1995). 1 ed. Genève, Switzerland. p. 120, 2008.
- MASSART, D. et al. Data Handling in Science and Technology Volume 20A. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Amsterdam: *Elsevier*, 1997.
- MOLOGNONI, L. et al. A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. *Talanta*, v. 178, p. 1053 - 1066, 2018.
- MOLOGNONI, L. et al. Different approaches for digestion, performance assessment and measurement uncertainty for the analysis of cadmium and lead in feeds. *Food Analytical Methods*, v. 10, p.1787-1799, 2016.
- MOLOGNONI, L. et al. Influence of method validation parameters in the measurement uncertainty estimation by experimental approaches in food preservatives analysis. *Food Chemistry*, v. 282, p. 147-152, 2019.
- MOLOGNONI, L. et al. The role of measurement uncertainty in the conformity assessment of the chemical composition of feeds. *Microchemical Journal*, v.131, p.79-91, 2017.
- OLIVEIRA, T. et al. Method development and total uncertainty estimation for boron, sulfur and phosphorus determination in mineral fertilizer using ICP OES. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.27, p.2021-2033, 2016.

PULIDO, A. et al. Uncertainty of results in routine qualitative analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v.22, p.647-654, 2003.

ROBBINS CARLOS, K.; DE JAGER, L. Comparison of multiple methods for the determination of sulphite in Allium and Brassica vegetables. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 33, n. 10, p. 1509-1517, 2016.

ROBBINS, K. et al. Development of a Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Sulfite in Food. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 63, p. 5126-5132, 2015.

ROZET, E. et al. Models to estimate overall analytical measurements uncertainty: Assumptions, comparisons and applications. *Analytica Chimica Acta*, v. 702, p.160-171, 2011.

RUIZ-CAPILLAS, C.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Application of flow injection analysis for determining sulphites in food and beverages: A review. *Food Chemistry*, v. 112, n. 2, p. 487-493, 2009.

SONG, R.; SCHLECHT, P.; ASHLEY, K. Field screening test methods: performance criteria and performance characteristics. *Journal of Hazardous Materials*, v. 83, n. 1-2, p. 29-39, 2001.

TAYLOR, B. Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results, Diane Publishing, 2009.

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

As carnes e derivados ainda são considerados muito importantes para uma dieta equilibrada devido à sua riqueza nutricional, mesmo relacionadas a muitas doenças. Além disso, a industrialização da carne é uma fonte geradora de desenvolvimento econômico e tecnológico para o Brasil. As evidências apresentadas nesta tese de doutorado corroboram a decisão da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) de classificar as carnes processadas como cancerígenas para humanos. No entanto, este estudo demonstrou que essa classificação deve considerar os diferentes tipos de produtos cárneos, bem como a composição química e microbiológica das matrizes e tipo de processamento. O 1,4-dinitro-2-metilpirrole (DNMP) e o ácido etilnitrólico (ENA) foram detectados em amostras de salsicha, mortadela, patê e bacon comercializados no Brasil. Concluiu-se que as amostras, além de estarem não conformes quanto ao uso de conservantes, também apresentavam condições sanitárias inadequadas que favoreceram a formação de ENA e DNMP, caracterizando um problema de saúde pública. Foi demonstrado que os constituintes alimentares (antioxidantes) e modificações no processamento podem influenciar na formação e estabilidade de compostos tóxicos que podem estar presentes.

Foi possível traçar um perfil físico-químico de matrizes complexas, como os produtos cárneos, proporcionada pela aplicabilidade das ferramentas analíticas inovadoras desenvolvidas. Desenvolveram-se com êxito métodos analíticos capazes de determinar moléculas com distintas características em vários tipos de carnes, pescados e derivados. Diferentes abordagens estatísticas foram projetadas permitindo a reprodução de medições de confiabilidade, gerando novos modelos, hipóteses e ferramentas para a Metrologia Química. Os compostos mutagênicos ENA e DNMP foram sintetizados e caracterizados com sucesso, permitindo uma pureza suficiente para o desenvolvimento e validação do primeiro método de análise simultânea em produtos cárneos.

A cepa selvagem LB-UFSC 001 de *L. bulgaricus* biodegradou os compostos mutagênicos ENA e DNMP formados em mortadelas processadas neste estudo. A detecção dos principais metabólitos das reações de biodegradação levantou hipóteses como: ação desmutagênica provida por *L. bulgaricus* sobre o ENA e DNMP através de reações enzimáticas envolvendo nitrorredutases e nitrilas hidratases. As incertezas experimentais e teóricas levantadas neste estudo conferiram credibilidade e expuseram as suas principais limitações.

A importância desta tese de doutorado para a ciência e sociedade cobriu aspectos de segurança alimentar, segurança química, entre outros aspectos relacionados à segurança do consumidor. Foi demonstrada inovação química através da publicação de seis artigos científicos em periódicos internacionais com estratos Qualis Capes A1, gerando resultados surpreendentes para a Ciência dos Alimentos. Até o momento, foram contabilizadas 21 citações aos trabalhos desta tese na base *Scopus*, resumos expandidos foram apresentados em congressos internacionais, bem como palestras derivadas de sua fundamentação teórica foram apresentadas em institutos de pesquisa e feiras comerciais. Além disso, pela primeira vez na literatura foram demonstrados detalhes sobre a formação, estabilidade e degradação do ENA e DNMP em condições reais de processamento de carnes. Esses resultados poderão auxiliar em novas reavaliações sobre o uso de conservantes em produtos cárneos.

Estudos complementares, como a proteômica comparativa da expressão diferencial de proteínas induzidas pela presença de DNMP e ENA em processo fermentativo com *L. bulgaricus* estão sendo conduzidos para elucidar quais potenciais enzimas estão atuando na biodegradação descrita nesta tese. Compreender a formação desses carcinogênicos pode apoiar melhor a avaliação de risco para o aumento da incidência de cânceres relacionados a fatores ambientais como a dieta.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, O. et al. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. *Food Chemistry*, v. 246, p. 6-17, 2018.
- CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, v. 71, p. 107-120, 2018.
- DE OLIVEIRA, I.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. Nitroreductases: enzymes with environmental, biotechnological and clinical importance. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2. ed. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2010. p. 1008-1019.
- FUCHS, S. et al. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 4, p. 1398-1407, 2008.
- HASKARD, C.; BINNION, C.; AHOKAS, J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*, v. 128, n. 1, p. 39-49, 2000.
- HAYATSU, H.; CHUNG, K.; NAKAJIMA, T. Generation of mutagenic compound (s) by a reaction between sorbic acid and nitrite. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, v. 30, p. 417-419, 1975.
- HERRAIZ, T.; GALISTEO, J. Nitrosative deamination of 2'-deoxyguanosine and DNA by nitrite, and antinitrosating activity of β -carboline alkaloids and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, v. 112, p. 282-289, 2018.
- HERRMANN, S. et al. Dietary exposure to volatile and non-volatile N-nitrosamines from processed meat products in Denmark. *Food and Chemical Toxicology*, v. 80, p. 137-143, 2015.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). *Monographs Evaluate Consumption of Red Meat and Processed Meat. Vol. 114, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. Lyon, France: Who Press, 2015. 511p. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono114.pdf>>. Acesso em 09 nov. 2018.
- KIM, D. et al. Estimation of the soil hazardous concentration of methylparaben using a species sensitivity approach. *Environmental Pollution*, v. 242, p. 1002-1009, 2018.
- KITO, Y.; NAMIKI, M.; TSUJI, K. A new n-nitropyrrole: 1,4-Dinitro-2-methylpyrrole, formed by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite. *Tetrahedron*, v. 34, n. 5, p. 505-508, 1978.

- LATINO-MARTEL, P. et al. Alcoholic beverages, obesity, physical activity and other nutritional factors, and cancer risk: A review of the evidence. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 99, p. 308-323, 2016.
- MOLOGNONI, L. et al. Development of a new analytical tool for assessing the mutagen 2-methyl-1,4-dinitro-pyrrole in meat products by LC-ESI-MS/MS. *Talanta*, v. 185, p. 151-159, 2018a.
- MOLOGNONI, L. et al. A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. *Talanta*, v. 178, p. 1053-1066, 2018b.
- MOLOGNONI, L. et al. A simple and fast method for the inspection of preservatives in cheeses and cream by liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 147, p. 370-382, 2016a.
- MOLOGNONI, L. et al. Development of a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of sorbic acid, natamycin and tylosin in Dulce de leche. *Food Chemistry*, v. 211, p. 748-756, 2016b.
- NAMIKI, M. et al. Chemical aspects of mutagen formation by sorbic acid-sodium nitrite reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 29, n. 2, p. 407-411, 1981.
- RAJKOVIC, A.; SMIGIC, N.; DEVLIEGHERE, F. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *International Journal of Food Microbiology*, v. 141, p. S29-S42, 2010.
- ROBACH, M.; SOFOS, J. Use of Sorbates in Meat Products, Fresh Poultry and Poultry Products: A Review. *Journal of Food Protection*, v. 45, n. 4, p. 374-383, 1982.
- ROBACH, M.; STATELER, C. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Potassium Sorbate in Combination with Sodium Chloride, Tertiary Butylhydroquinone, Butylated Hydroxyanisole or Ethylenediamine Tetraacetic Acid. *Journal of Food Protection*, v. 43, n. 3, p. 208-211, 1980.
- SANTOS, J. et al. Scope extension validation of a LC-MS method for the inspection of preservatives in butter. *Food Control*, v. 67, p. 209-215, 2016.
- SCOTTER, M.; CASTLE, L. Chemical interactions between additives in foodstuffs: a review. *Food Additives and Contaminants*, v. 21, n. 2, p. 93-124, 2004.
- SERRANO-GONZÁLEZ, M. et al. Biotransformation and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by microbial metabolism and their interaction. *Defence Technology*, v. 14, n. 2, p. 151-164, 2018.
- SHIM, S. et al. Consumers' knowledge and safety perceptions of food additives: Evaluation on the effectiveness of transmitting information on preservatives. *Food Control*, v. 22, n. 7, p. 1054-1060, 2011.

VITAGLIONE, P.; FOGLIANO, V. Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. *Journal of Chromatography B*, v. 802, n. 1, p. 189-199, 2004.

WANG, W.; KANNAN, K. Fate of Parabens and Their Metabolites in Two Wastewater Treatment Plants in New York State, United States. *Environmental Science & Technology*, v. 50, n. 3, p. 1174-1181, 2016.

YOSHIMURA, Y. et al. Significant advancement of mass spectrometry imaging for food chemistry. *Food Chemistry*, v. 210, p. 200-211, 2016.

ZHANG, H. et al. Analysis of the monitoring status of residual nitrite in meat products in China from 2000 to 2011. *Meat Science*, v. 136, p. 30-34, 2018.

APÊNDICE A – Síntese dos mutagênicos

2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP): duas soluções foram preparadas dissolvendo-se 16,5 de nitrito de sódio em 64 mL de água e 4,41 g de sorbato de potássio em 1300 mL de água. As duas soluções foram misturadas e aquecidas à temperatura de 60°C, mantendo-se o pH em torno de 3,5 por gotejamento direto de ácido sulfúrico 2 mol/L sobre o meio reacional, durante duas horas. Procedeu-se à partição com diclorometano em funil de separação, adicionando-se cinco volumes de 75 mL. A fração precipitada, de coloração amarela (fase orgânica), foi lavada com duas porções de 100 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. Em seguida, foi seca em sulfato de sódio e carvão ativo, filtrada e finalmente evaporada em rota-evaporador. Foram obtidos cerca de 200 mg do composto.

Ácido etilnitrólico (ENA): um volume de nitroetano (8 mL) foi adicionado a uma solução de hidróxido de potássio 1 mol L⁻¹ (100 mL). Um total de 8,9 g de nitrito de sódio foi solubilizado nessa solução em meio controlado à 0 °C. Ácido sulfúrico (5 mol L⁻¹) foi gotejado para manter o pH do meio em 4.2, sob controle de um potenciômetro. Utilizaram-se quatro volumes de éter etílico (50 ml cada) para a extração do composto num funil de separação. Em seguida, a fase orgânica obtida foi seca em sulfato de sódio e carvão ativado e posteriormente filtrado. Finalmente, o produto foi recristalizado utilizando clorofórmio.

O espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foi obtido no espectrômetro Bruker Avance 200, operando em 200 MHz. Cerca de 20 mg de dos compostos dissolvidos em clorofórmio deuterado (CDCl₃), utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em parte por milhão (ppm) da frequência de operação em relação ao TMS. Entre parênteses estão a multiplicidade (s = singleto, d = dubleto, dd = duplo dubleto, t = tripleto, m = multiplete, sl = singleto largo), o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa e a constante de acoplamento (J) expressa em Hertz (Hz).

Tabela A1 – Resultados da caracterização por espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) (^1H NMR, 200 MHz, CDCl_3) para o ácido etilnitrólico.

Chemical shifts, in ppm (δ)	Multiplicity parameters*
2.46	singlet, 3H, CH_3
9.86	broad, 1H, OH

Figura A1 – Resultados da caracterização por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) do ácido etilnitrólico, conforme mencionado no capítulo III.

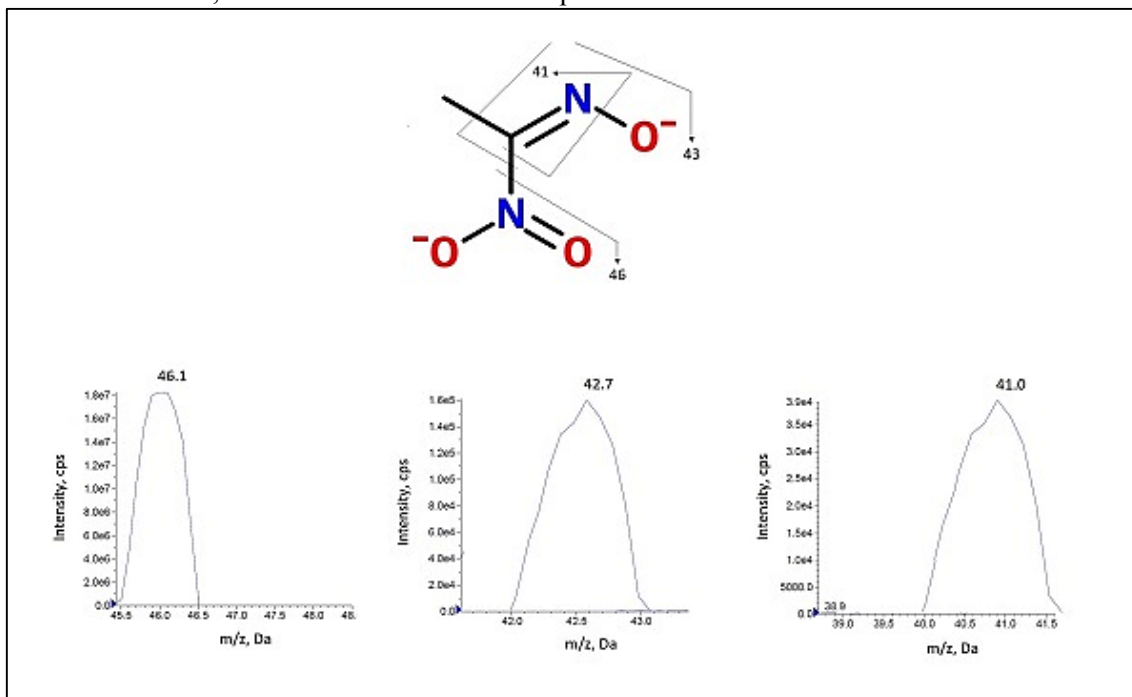


Tabela A2 – Resultados da caracterização por espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) (^1H NMR, 200 MHz, CDCl_3) para o 2-metil-1,4-dinitro pirrol.

Chemical shifts (δ), in ppm	Multiplicity parameters
2.65	s, 3H, CH_3
7.93	d, 1H, CH-C-NO_2
8.90	d, 1H, CH-N-NO_2

Figura A2 – Resultados da caracterização por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) do 2-metil-1,4-dinitro pirrol, conforme mencionado no capítulo III.

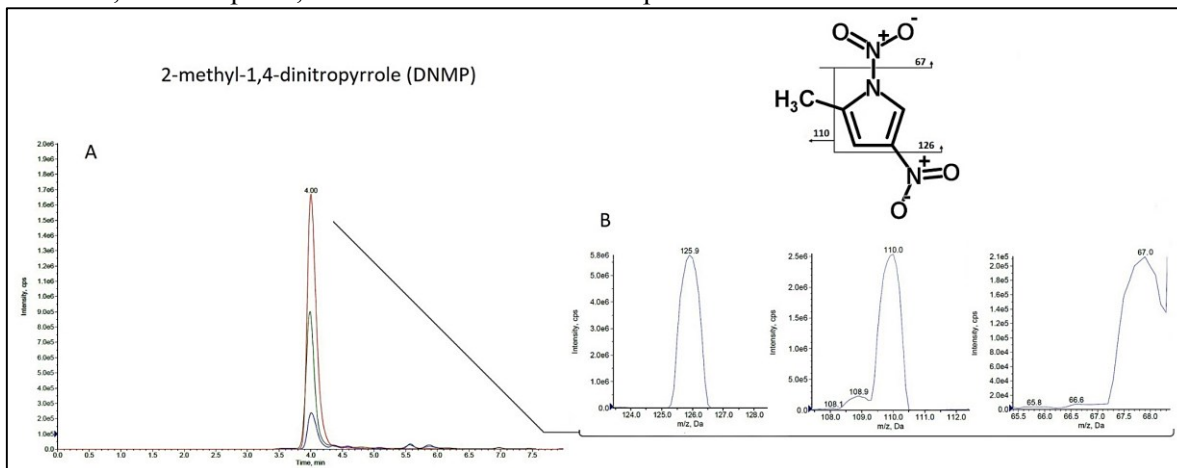


Tabela A3 – Parâmetros instrumentais de espectrometria de massas utilizados durante o desenvolvimento do capítulo IV.

Analito (número do Cas)	Íon precursor (m/z, in Da)	Íons de fragmentação (m/z, in Da)	DP (V)	EC (V)
2-metil-1,4-dinitro pirrol (75142-42-6)	171,9	125,1; 67,0; 109,0	30-61	23
5-metil-1-nitro-3-aminopirrol (135325-54-1)	142,0	125,0; 110,0; 81,0	25-50	25
1-metilpirrolidina-3-amino (13220-27-4)	101,0	57; 43	25-100	25
2-metil-1H-pirrol (636-41-9)	82,0	67,0; 39,0	25-100	23
1-H-pirrol (109-97-7)	68,0	39,0; 41,0	25-100	15
1-metilimidazol (616-47-7)	83,0	56,0; 54,0; 42,0	56	10
Ácido etilnitrólico (600-26-0)	102,9	46,1; 42,7; 41,0	-50	-50
Óxido de acetonitrila (7063-95-8)	56,5	41,0	(-) 10-50	-40
Ácido acetohidroxâmico (546-88-3)	76,0	57,0; 56,0; 41;	50	35
Acetamida (60-35-5)	59,0	43,0; 44,0	25 -100	17
Ácido sorbico (110-44-1)	112,9	67,0; 65,0	56	17
Cloreto 3,5-dinitrobenzoíco (99-33-2)	210,9	166,9	-45	-14
N-nitrosopirrolidina-d4 (57371-40-1)	105,1	59,2; 44,2; 41,1	86	50

APÊNDICE B – Modelagem matemática para a estimativa de incertezas de medição

Incerteza padrão combinada (68%): propagação de todas as incertezas padrão de saída (68%) do processo de medição, mostrado pela equação S1.

$$u_c^2 = S_r^2 + S_z^2 + \sum_{i=1,n} \sum_{j=1,n} \left[\frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 f}{\partial x_i \partial x_j} \right)^2 + \frac{\partial f}{\partial x_i} \frac{\partial^3 f}{\partial x_i \partial x_i^2} \right] u^2(x_i) u^2(x_j) \quad (B1)$$

Onde u_c : incerteza padrão combinada, S_r : variância referente ao efeito randômico do instrumento e S_{z_i} : variância referente efeito randômico do processo analítico, onde z_i representa o número de variáveis de medição.

A sentença $\left(\sum_{i=1,n} \sum_{j=1,n} \left[\frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 f}{\partial x_i \partial x_j} \right)^2 + \frac{\partial f}{\partial x_i} \frac{\partial^3 f}{\partial x_i \partial x_i^2} \right] u^2(x_i) u^2(x_j) \right)$, representa a propagação de variâncias e covariâncias dependentes do modelo.

Onde, x_i, x_j = variáveis, $\frac{\partial f}{\partial x_i}, \frac{\partial f}{\partial x_j}$ = derivadas parciais do modelo global e r_{ij} = coeficiente de correlação estimado.

As equações S2 e S3 foram aplicadas para determinar os parâmetros de correlação das variáveis durante o estudo:

$$u(y_i, y_j) = \frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x}_i) \cdot (x_j - \bar{x}_j) \quad (B2)$$

$$r(y_i, y_j) = \frac{u(x_i, x_j)}{u(x_i) \cdot u(x_j)} \quad (B3)$$

Where y_i = input variable x_i ; y_j = input variable x_j ; \bar{x}_i = mean value of x_i ; \bar{x}_j = mean value of x_j ; $r(y_i, y_j)$ = correlation coefficient of the output standard uncertainties y_i and y_j .

Incerteza padrão expandida (95%): Por fim, a incerteza padrão expandida foi calculada conforme a Equação S4:

$$U(y) = k \cdot u_c(y_i) \quad (\text{B4})$$

Onde $U(y_i)$ = incerteza padrão expandida; $u_c(y_i)$ = incerteza padrão combinada k = coeficiente de abrangência com 95% de probabilidade de acerto considerando uma distribuição tipo t-Student.

Equação S5 mostra o *Erro normalizado* ($E_n\%$)

$$E_n = \frac{x_i - x_j}{\sqrt{U_i^2 + U_j^2}} \quad (\text{B5})$$

Onde i e j são médias independentes de parâmetros de mesma unidade dimensional e U_i e U_j são suas respectivas incertezas padrão expandidas (95%). Valores de E_n abaixo de 1 não apresentam diferença significativa.

APÊNDICE C – Publicações

ARTIGOS PUBLICADOS

Figura C1– Artigo sobre o Capítulo I.

Food Research International 125 (2019) 108608



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres



Review

Interactions of preservatives in meat processing: Formation of carcinogenic compounds, analytical methods, and inhibitory agents

Luciano Molognoni^{a,b,c}, Heitor Daguer^{a,*}, Gabriel Emiliano Motta^c, Thais Cardoso Merlo^d, Juliano De Dea Lindner^{c,**}

^a Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, Seção Laboratorial Avançada em Santa Catarina (SLAV/SC/LFDA/RS), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, São José, SC 88102-600, Brazil

^b Instituto Catarinense de Sanidade Agropecuária (ICASA), Florianópolis, SC 88034-001, Brazil

^c Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC 88034-001, Brazil

^d Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (USP), Av. Pádua Dias, 11, Piracicaba, SP 13418-900, Brazil



Figura C2 – Artigo sobre o Capítulo II.

Talanta 178 (2018) 1053–1066



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta



A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS

Luciano Molognoni^{a,b,c}, Heitor Daguer^a, Leandro Antunes de Sá Ploêncio^{a,d}, Juliano De Dea Lindner^{c,*}

^a Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário, Seção Laboratorial Avançada de São José (SLAV/SC/LANAGRO/RS), São José, SC 88102-600, Brazil

^b Instituto Catarinense de Sanidade Agropecuária (ICASA), Florianópolis, SC 88034-001, Brazil


^c Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Florianópolis, SC 88034-001, Brazil

^d UFSC, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Departamento de Química, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil



Figura C3 – Primeiro artigo do Capítulo III.


Talanta 185 (2018) 151–159



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta




Development of a new analytical tool for assessing the mutagen 2-methyl-1,4-dinitro-pyrrole in meat products by LC-ESI-MS/MS

Luciano Molognoni^{a,b,c}, Heitor Daguer^a, Leandro Antunes de Sá Plôencio^{a,b,d},
Suzana Eri Yotsuyanagi^e, Ana Lucia da Silva Correa Lemos^e, Antonio Carlos Joussef^d,
Juliano De Dea Lindner^{c,*}

^a Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário, Seção Laboratorial Avançada de São José (SLAV/SC/LANAGRO/RS), São José, SC 88102-600, Brazil
^b Instituto Catarinense de Sanidade Agropecuária (ICASA), Florianópolis, SC 88034-000, Brazil
^c Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, SC 88034-000, Brazil
^d UFSC, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Departamento de Química, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil
^e Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado de São Paulo, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia de Carnes, Campinas, SP 13073-001, Brazil

Figura C4 – Segundo artigo do Capítulo III.


Journal of Chromatography A xxx (xxxx) xxx-xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com



Assessing the mutagens ethylnitrolic acid and 2-methyl-1,4-dinitro-pyrrole in meat products: Sample preparation and simultaneous analysis by LC-MS/MS


Luciano Molognoni^{a, b, c}, Heitor Daguer^a, Rodrigo Barcellos Hoff^a, Janh Rodrigues^d, Antonio Carlos Joussef^d,
Juliano De Dea Lindner^{c,*}

^a Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, São José, SC 88102-600, Brazil
^b Instituto Catarinense de Sanidade Agropecuária, Florianópolis, SC 88034-000, Brazil
^c Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC 88034-000, Brazil
^d UFSC, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Departamento de Química, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

Figura C5 – Artigo sobre o Capítulo V.


Food Chemistry 282 (2019) 147–152

Contents lists available at ScienceDirect



Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Analytical Methods

Influence of method validation parameters in the measurement uncertainty estimation by experimental approaches in food preservatives analysis

Luciano Molognoni^{a,b,c,*}, Heitor Daguer^{a,*}, Iara Regina dos Santos^c, Juliano De Dea Lindner^c

^a Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário, Seção Laboratorial Avançada de São José (SLAV/SC/LANAGRO/RS), São José, SC 88102-600, Brazil

^b Instituto Catarinense de Sanidade Agropecuária (ICASA), Florianópolis, SC 88034-001, Brazil

^c Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Florianópolis, SC 88034-001, Brazil







Figura C6 – Artigo sobre o Capítulo IV.





Food and Chemical Toxicology


Available online 12 November 2019, 110964

In Press, Corrected Proof 



Microbial biotransformation of N-nitro-, C-nitro-, and C-nitrous-type mutagens by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in meat products

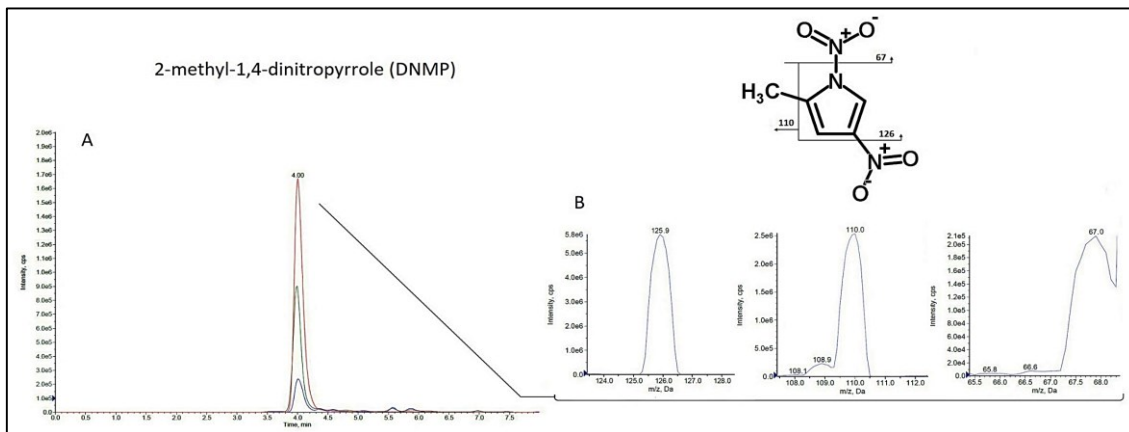
Luciano Molognoni^{a, b, c}, Gabriel Emiliano Motta^a, Heitor Daguer^b, Juliano De Dea Lindner^a  

 **Show more**

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110964> [Get rights and content](#)

ERRATA PUBLICADA

Figura C7 – Errata publicada: “Corrigendum to Development of a new analytical tool for assessing the mutagen 2-methyl-1,4-dinitro-pyrrole in meat products by LC-ESI-MS/MS”, Talanta 185, p. 151–159, 2018. [doi: 10.1016/j.talanta.2019.03.084](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.084)



Analysis of DNMP by LC-MS/MS, where A: reverse phase chromatogram of three transitions employing cyanopropyl stationary as phase; B: mass spectra of the DNMP (exact mass: 171.0 g mol⁻¹), parent ion: 171.9 m/z, fragments: 126.0 m/z (loss of NO₂), 110.9 m/z (loss of NO₂, CH₃), and 66.8 m/z (loss of NO₂, NO₂, CH₃).