



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIA FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Wilson Clemente dos Passos

**Desenvolvimento de método analítico para determinação de N-Nitrosaminas
em produto cárneo empregando Microextração em Fase Sólida e
Cromatografia Gasosa**

Florianópolis

2023

Wilson Clemente dos Passos

**Desenvolvimento de método analítico para determinação de N-Nitrosaminas
em produto cárneo empregando Microextração em Fase Sólida e
Cromatografia Gasosa**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de química - bacharelado do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Vitali
Coorientadora: Msc. Amanda Tavares Germano

Florianópolis

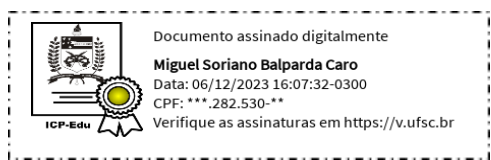
2023

Wilson Clemente dos Passos

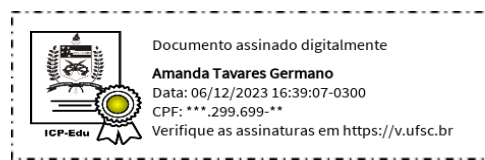
**Desenvolvimento de método analítico para determinação de N-Nitrosaminas
em produto cárneo empregando Microextração em Fase Sólida e
Cromatografia Gasosa**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Química e aprovado em sua forma final pelo Curso de Química.

Florianópolis, 28 de novembro de 2023.

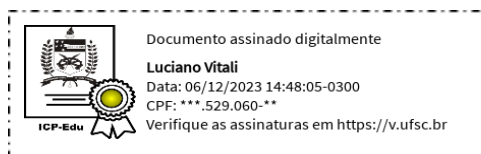


Coordenação do Curso

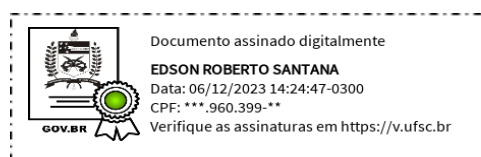


Msc. Amanda Tavares Germano
Coorientadora

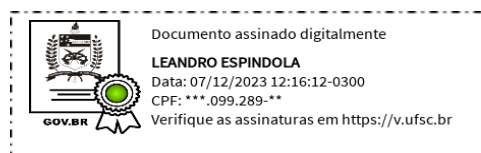
Banca examinadora



Prof. Luciano Vitali, Dr.
Orientador



Prof. Edson Roberto Santana, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Leandro Espíndola, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023.

Passos, Wilson Clemente dos

Desenvolvimento de método analítico para determinação de N-Nitrosaminas em produto cárneo empregando Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa / Wilson Clemente dos Passos ; orientador, Luciano Vitali, coorientadora, Amanda Tavares Germano, 2023.

52 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Graduação em Química - Bacharelado, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Química - Bacharelado. 2. N-Nitrosaminas. 3. Produtos cárneos. 4. Cromatografia Gasosa. 5. Microextração em fase sólida. I. Vitali, Luciano. II. Germano, Amanda Tavares. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Química - Bacharelado. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram no decorrer desta jornada, em especialmente:

Agradeço à Deus pelo caminho trilhado, pelas oportunidades que tive, pelas batalhas vencidas e por fornecer coragem e força em momentos que o corpo já não correspondia.

Aos meus pais, Valdemir e Eliane, que da forma de vocês me deram o apoio e suporte durante toda a minha trajetória. Aos meus irmãos, que de uma forma ou de outra contribuíram com minha formação. Aos meus avós, em especial meu avô Joca, o qual deu suporte financeiro escondido da família e que acima de tudo é meu exemplo de vida, superando barreiras a cada dia e me ensinando a ser uma pessoa melhor.

Ao meu orientador, Luciano Vitali, por todo o suporte a mim ofertado desde o dia em que entrei em sua sala e sai com o projeto de IC, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela disponibilidade em me atender e tirar dúvidas bobas, por toda a manutenção feita nos equipamentos e principalmente por todo o conhecimento transmitido, meu muito obrigado.

À minha coorientadora, Amanda, a qual carinhosamente chamo por minha madrinha científica, agradeço pela coragem que você teve ao me acolher em minha primeira experiência com IC e por toda a paciência que você teve em me ensinar, pelos puxões de orelha quando preciso, por me inserir em projetos paralelos que enriqueceram minha graduação, pela nossa dinâmica a qual consistia em longas conversas buscando resolver os problemas que surgiam, por estimular prazos e pelos conselhos dados que não se limitaram somente ao meio acadêmico, o meu mais profundo agradecimento.

As pessoas que tive a honra de conhecer ou me tornar mais próximo devido ao LabECC, embora eu ficasse isolado no lab 102, sempre contribuíram no dia-a-dia e tornaram os dias mais leves e fáceis.

A todos os amigos que fiz durante a graduação, em especial as minhas parceiras de laboratório, Larichutz e Isabela, sem vocês não teria chegado até aqui, são minhas irmãs que não tive, amo vocês e agradeço infinitamente a amizade e parceria que desenvolvemos ao longo do tempo.

Aos professores do departamento de Química da UFSC pelo ensinamento e pelos anos de convivência, ajudando na minha formação.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela excelência de ensino, pesquisa e extensão, ao Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo aporte financeiro.

À banca pela disponibilidade de avaliar e contribuir com esse trabalho.

A todos aqui citados, o meu muitíssimo obrigado.

RESUMO

As N-Nitrosaminas (NAs) foram recentemente descobertas como contaminantes em diferentes matrizes, entre elas produtos cárneos processados. Estes compostos possuem um alto potencial carcinogênico, que amplia a preocupação sobre o assunto. A formação das NAs em alimentos cárneos é proveniente da reação entre o nitrito, que é utilizado como conservante nesses produtos, e substratos nitrosáveis, como as aminas secundárias. Devido à possível formação das NAs em produtos de consumo humano e o risco gerado à saúde do consumidor, alguns órgãos reguladores estabelecem limites para as concentrações das NAs. Diferentes métodos analíticos já foram utilizados para a determinação das NAs, tais métodos geralmente são baseadas no uso de equipamentos robustos, porém com preparos de amostra clássicos como extração líquido-líquido e extração sólido-líquido. Dessa forma, foi proposto no presente projeto o emprego da técnica de Microextração em Fase Sólida (SPME) pelo modo *headspace* (HS), a qual possui atributos que conferem um caráter mais eficiente e verde que as demais extrações convencionais, permitindo alcançar baixos limites de detecção ao ser combinada com a técnica de Cromatografia Gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID). Esta técnica cromatográfica é amplamente utilizada em Laboratórios de Controle de Qualidade devido ao seu custo mais acessível, logo difundir sua aplicabilidade nas determinações das NAs é um fator positivo a ser explorado. Foram otimizados parâmetros instrumentais para a separação e detecção adequadas da N-Nitrosodietilamina (NDEA) e N-Nitrosodimetilamina (NDMA), os quais resultaram em uma corrida cromatográfica de cerca de 8 minutos. Os diferentes parâmetros da HS/SPME otimizados revelaram como condições ideais o emprego da fibra PDMS/Car/DVB, solução da amostra em pH 7, força iônica ajustada para 30% de NaCl, temperatura de extração de 35 °C e tempo de extração 60 min. Além disso, foram avaliados os parâmetros de mérito do método analítico desenvolvido, obtendo-se limite de detecção de 4 e 38 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e de quantificação entre 14 e 156 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para NDEA e NDMA, respectivamente. O desvio padrão relativo das precisões (intra-dia e inter-dia) variou entre 2,6 a 11,6% e os valores das recuperações ficaram na faixa de 92,3 a 111,5%. O método desenvolvido foi aplicado para duas amostras comerciais de salsicha obtidas em diferentes comércios locais, nas quais não foram detectadas as NAs avaliadas. Para alcançar limites inferiores aos obtidos e permitir a quantificação do analito, outros ajustes na técnica poderiam ser explorados para aumentar sua eficiência.

Palavras-chave: NDEA; NDMA; N-Nitrosaminas; Contaminantes; Cromatografia Gasosa; Microextração em fase sólida; produtos cárneos.

ABSTRACT

N-Nitrosamines (NAs) have recently been discovered as contaminants in various matrices, including processed meat products. These compounds possess a high carcinogenic potential, raising significant concerns. The formation of NAs in meat products originates from the reaction between nitrite, used as a preservative in these products, and nitrosatable substrates such as secondary amines. Due to the potential formation of NAs in products for human consumption and the associated health risks, some regulatory bodies establish limits on NA concentrations. Various analytical methods have been employed to determine NAs, often relying on robust equipment and classical sample preparations such as liquid-liquid extraction and solid-liquid extraction. In this project, we propose the use of Solid-Phase Microextraction (SPME) in the headspace (HS) mode, a technique with attributes that make it more efficient and environmentally friendly than conventional extractions. When combined with Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC/FID), this method allows for achieving low detection limits. This chromatographic technique is widely used in Quality Control Laboratories due to its cost-effectiveness, making its application in NA determinations a positive aspect to explore. Instrumental parameters were optimized for proper separation and detection of N-Nitrosodietilamine (NDEA) and N-Nitrosodimethylamine (NDMA), resulting in a chromatographic run of approximately 8 minutes. The optimized HS/SPME parameters identified the use of the PDMS/Car/DVB fiber, a sample solution at pH 7, ionic strength adjusted to 30% NaCl, extraction temperature of 35 °C, and an extraction time of 60 minutes as ideal conditions. Additionally, the analytical method's performance parameters were evaluated, yielding detection limits of 4 and 38 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ and quantification limits between 14 and 156 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ for NDEA and NDMA, respectively. The relative standard deviation of precision (intra-day and inter-day) ranged from 2,5 to 11,6%, and recovery values fell within the range of 92,3 to 111,5%. The developed method was applied to two commercial sausage samples obtained from different local retailers, where the evaluated NAs were not detected. To achieve lower limits and enable analyte quantification, further adjustments to the technique could be explored to enhance its efficiency.

Keywords: *NDMA; NDEA; N-Nitrosamines; Contaminants; Gas Chromatography; Solid-Phase Microextraction; meat products.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da N-Nitrosodimetilamina (NDMA) e N-Nitrosodietilamina (NDEA).....	14
Figura 2 - Mecanismo de formação de nitrosaminas em produtos cárneos.....	15
Figura 3 - Etapas da microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> (HS/SPME).....	19
Figura 4 - Esquema de um equipamento de Cromatografia Gasosa acoplado com detector de ionização em chama.....	23
Figura 5 - Sistema para o preparo de amostra HS/SPME. Legenda da imagem: 1 - Agitador magnético, 2 - Cella de vidro conectada com mangueiras ao banho termostatzado, 3 – Frasco de vidro de SPME com amostra, 4 – Holder com a fibra no HS do frasco da amostra, 5 – Termômetro, 6 – Banho termostatzado.....	28
Figura 6 - Separação cromatográfica da NDMA e NDEA, ambas a 25 mg L ⁻¹ , em metanol. Legenda: 1 - MeOH (5,21 min), 2 - NDMA (7,26 min), 3 e 5 - Interferentes (7,55 e 8,02 min), 4 - NDEA (7,65 min).....	33
Figura 7 - Gráfico das áreas de sinal normalizadas para NDMA e NDEA com as diferentes fibras comerciais (PA, PDMS/DVB e PDMS/Car/DVB).....	36
Figura 8 - Gráfico das áreas normalizadas de NDMA e NDEA com e sem uso de ultrassom por 10 min.....	37
Figura 9 - Gráfico das áreas normalizadas das NAs em diferentes pH utilizados	38
Figura 10 - Curvas de distribuição de espécies para a NDMA.....	39
Figura 11 - Curvas de distribuição de espécies para a NDEA.....	39
Figura 12 - Superfícies de resposta obtidas através do planejamento composto central para otimização da temperatura, tempo de extração e % de NaCl na extração das NAs.....	40
Figura 13 - Cromatograma comparativo entre a matriz de salsicha fortificada com 5 mg Kg ⁻¹ de NDMA e NDEA (a) e a matriz de salsicha isenta (b). Legenda: 1, 2, 3, e 4 - Interferentes (3,83; 4,22; 5,54 e 6,58 min), 5 - NDMA (7,22min), 6 - NDEA (7,65 min).	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos da literatura para determinação de NAs em produtos cárneos..	17
Tabela 2 - Fibras comerciais para SPME e suas características.....	20
Tabela 3 - Planejamento do composto central para a otimização da temperatura de extração, tempo de extração e % de NaCl adicionado à amostra na extração via HS/SPME.....	30
Tabela 4 - Parâmetros de separação cromatográfica das NAs em injeção direta de 25 mg L ⁻¹ de NDMA e NDEA para o método HS/SPME-GC/FID.....	34
Tabela 5 - Tabela ANOVA do planejamento do composto central para extração das NAs no método HS/SPME-GC/FID.....	41
Tabela 6 - Figuras de mérito do método otimizado para a determinação de NDMA e NDEA por HS/SPME-GC/FID.....	43
Tabela 7 - Dados experimentais das amostras reais de salsicha de diferentes fornecedores analisadas empregando o método HS/SPME-GC/FID frente a NDMA e NDEA.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

D- μ -SPE - Extração dispersiva em fase microsólida, do inglês *“Dispersive microsolid-phase extraction”*

EPI - Equipamentos de proteção individual

FID - Detector de ionização em chama, do inglês *“Flame ionization detector”*

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *“Gas Chromatography”*

GC-MS/MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas operando no modo tandem, do inglês *“Gas Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry”*

GC/FID - Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama, do inglês *“Gas Chromatography coupled to flame ionization detector”*

GC $\times$ GC-NCD - Cromatografia gasosa acoplada ao detector de quimioluminescência de nitrogênio, do inglês *“Gas chromatography–nitrogen chemiluminescence detector”*

HS - do inglês *Headspace*

HS-SPME-GC-TEA - Microextração em fase sólida pelo modo headspace acoplada a cromatografia gasosa com analisador de energia térmica, do inglês *“Headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–thermal energy analyzer”*

HS/SPME – Microextração em fase sólida pelo modo headspace, do inglês *“Headspace Solid Phase Microextraction”*

LLE - Extração líquido-líquido, do inglês *“Liquid-Liquid Extraction”*

LOD - Limite de detecção, do inglês *“Limit of Detection”*

LOQ - Limite de quantificação, do inglês *“Limit of Quantification”*

MAE–DLLME–GC–MS - Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por microondas acoplada a cromatografia gasosa e espectrometria de massa, do inglês *“Microwave-assisted extraction and dispersive liquid–liquid microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry”*

MS – Espectrômetro de massas, do inglês *“Mass Spectrometry”*

NAs - N-Nitrosaminas

NDEA - N-Nitrosodietilamina

NDMA - N-Nitrosodimetilamina

PA - Poliacrilato

PDMS - Polidimetilsiloxano

PDMS/Car/DVB - Polidimetilsiloxano/Carboxen/Divinilbenzeno

PDMS/DVB - Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno

R^2 - Coeficiente de determinação

RR - Recuperação relativa

RSD - Desvio padrão relativo

SPE – Extração em fase sólida, do inglês “*Solid Phase Extraction*”

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês “*Solid Phase Microextraction*”

TEA - Analisador de energia térmica, do inglês “*thermal energy analyzer*”

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Revisão da Literatura	14
2.1. N-Nitrosaminas	14
2.2. Ocorrência das N-Nitrosaminas em produtos cárneos	15
2.3. Legislação	16
2.4. Métodos analíticos para determinação de NAs	16
2.5. Microextração em Fase Sólida no modo headspace e Cromatografia Gasosa com detecção por ionização em chama	19
2.6. Validação de método	23
3. Objetivos	26
3.1. Objetivo Geral	26
3.2. Objetivos Específicos	26
4. Metodologia	27
4.1. Padrões, reagentes e materiais	27
4.2. Instrumentação	27
4.3. Preparo de amostra	28
4.4. Otimização do método cromatográfico via GC/FID	28
4.5. Otimização do preparo de amostra HS-SPME	29
4.5.1. Método de extração das NAs do extrato via HS/SPME.	29
4.5.2. Seleção de fibra	29
4.5.3. Ultrassom	30
4.5.4. Seleção de pH	30
4.5.5. Otimização multivariada	30
4.6. Método HS/SPME-GC/FID otimizado	31
4.7. Validação do método HS/SPME-GC/FID otimizado	32
4.8. Aplicação do método HS/SPME-GC/FID em produto cárneo	32
4.9. Segurança no laboratório	33
5. Resultados e discussões	34
5.1. Análise via HS/SPME-GC/FID	34
5.1.1. Otimização do método cromatográfico via GC/FID	34
5.1.2. Otimização do preparo de amostra HS/SPME	36
5.1.2.1. Seleção de fibra	36
5.1.2.2. Ultrassom	38
5.1.2.3. Seleção do pH	39
5.1.2.4. Otimização multivariada	41
5.2. Validação do método HS/SPME-GC/FID	43
5.3. Aplicação do método HS-SPME-GC-FID em amostras reais	46
6. Conclusão e Perspectivas	47
7. Referências	48

1. Introdução

As N-Nitrosaminas (NAs) são compostos orgânicos N-nitrosos que têm atraído muito interesse no meio científico ao serem recentemente descobertas como contaminantes em diferentes matrizes, como alimentos defumados e grelhados, laticínios, fumaça do cigarro, medicamentos e até mesmo em água residual.

A origem da formação desse contaminante pode variar de acordo com a amostra analisada. Em produtos cárneos as NAs são provenientes da reação entre o nitrito ou óxido nitroso e substratos nitrosáveis como aminas secundárias. A maioria dos íons nitrosônio gerados em produtos cárneos provém do nitrito, que geralmente é utilizado atuando como aditivo alimentar no processamento de carnes, sendo já comprovado a correlação de seu teor com a presença de NAs.

A preocupação sobre essa temática é cada vez maior, visto que esse grupo de compostos possuem um alto potencial carcinogênico. Desse modo, a exposição às NAs acima de níveis aceitáveis e por longos períodos aumenta consideravelmente o risco da ocorrência de câncer de esôfago, colorretal e gástrico.

Com o conhecimento do risco à saúde gerado pelas NAs, diferentes organizações estabeleceram limites máximos em alimentos. Dessa forma, o desenvolvimento de novas metodologias simples e eficazes na determinação das NAs torna-se fundamental para o controle de qualidade.

Atualmente os métodos analíticos disponíveis para determinação de NAs são baseadas no uso de equipamentos robustos e elevado valor de aquisição e manutenção como o GC-MS ou LC-MS, associados a preparos de amostra clássicos como a extração em fase sólida ou extração líquido-líquido.

Dessa forma, o presente trabalho investigou o emprego da técnica de preparo de amostra miniaturizado de Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês "*Solid-Phase Microextraction*") pelo modo *headspace* (HS), a qual é mais eficiente e verde que as extrações convencionais, para ser combinado com a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada com detector de ionização em chama (GC-FID), a qual é amplamente utilizada em Laboratórios de Controle de Qualidade devido ao seu custo de aquisição e manutenção mais acessível.

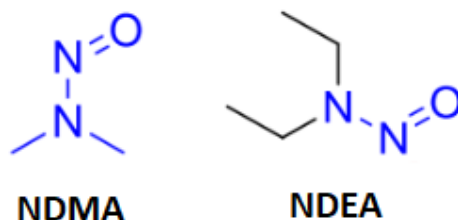
2. Revisão da Literatura

2.1. N-Nitrosaminas

As N-Nitrosaminas (NAs) são uma classe de compostos orgânicos N-nitrosos, aromáticos ou alifáticos, que possuem o R_2N-NO como componente estrutural básico. Eles também contêm um grupo nitroso funcional ligado a um átomo de nitrogênio (THRESHER et al., 2020).

As NAs são conhecidas por serem substâncias altamente tóxicas, e que mesmo em níveis residuais, provaram causar carcinogênese e mutagênese em animais e humanos, levando assim a uma série de doenças, como câncer de esôfago, colorretal e gástrico (LU et al., 2017). Dessa forma, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) classificou algumas NAs como provavelmente cancerígenos para humanos (Classe 2A), dentre elas a N-Nitrosodimetilamina (NDMA) e a N-Nitrosodietilamina (NDEA), as quais têm suas estruturas apresentadas na Figura 1.

Figura 1. Estrutura da N-Nitrosodimetilamina (NDMA) e N-Nitrosodietilamina (NDEA).



Fonte: Adaptado de BHARATE, 2021.

A NDMA é um composto solúvel em água, sua temperatura de vaporização é de 152 °C e a pressão de vapor é de 2,7 mmHg a 20°C. Por sua vez, a NDEA também é um composto solúvel em água, sua temperatura de vaporização é de 172 °C e a pressão de vapor é de 0,86 mm Hg a 20 °C (HAYNES, 2014; KLEIN, 1982).

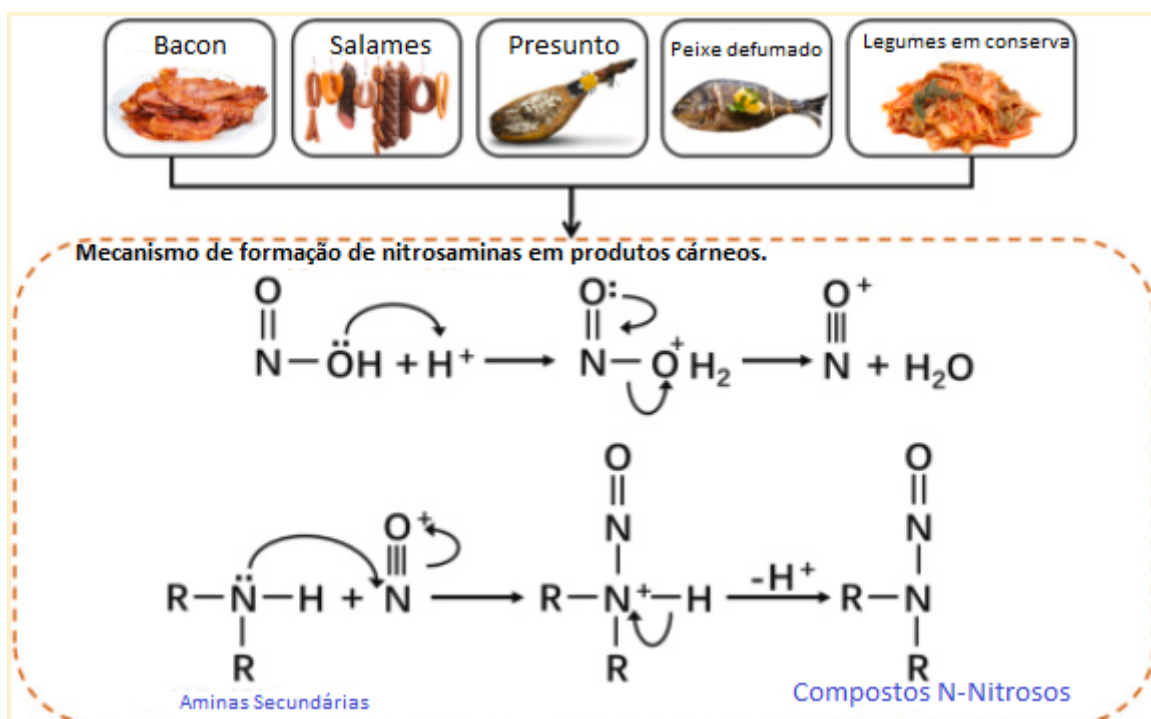
Uma vez conhecidos os efeitos nocivos das NAs e algumas propriedades da NDMA e da NDEA que viabilizam a sua determinação, é necessário entender como são formadas e em quais tipos de produtos podem estar presentes.

2.2. Ocorrência das N-Nitrosaminas em produtos cárneos

Devido a alta toxicidade, as NAs já foram alvo de estudos, sendo detectadas em fármacos, cigarros, laticínios, água e até mesmo em alimentos defumados e grelhados (FARRÉ et al., 2023; PÉREZ-ORTUÑO et al., 2016; DUTRA et al., 2008).

A formação das NAs em alimentos cárneos são provenientes da reação entre o nitrito ou óxido nitroso e substratos nitrosáveis como aminas secundárias, como mostrado na Figura 2. A maioria dos íons nitrosônio (NO^+) em produtos cárneos provém da presença do nitrito, o qual se converte nesta espécie na presença de meio ácido que atua como catalisador. Devido aos seus efeitos bactericidas e de proteção de cor, o nitrito geralmente é utilizado como aditivo alimentar no processamento de carnes, sendo já comprovado a correlação de seu teor com a presença de NAs (WOGAN, et al., 1975; DOMAŃSKA-BLICHARZ, et al., 2005).

Figura 2. Mecanismo de formação de nitrosaminas em produtos cárneos.



Fonte: (Adaptado de XIE, 2023)

As aminas que sofrem nitrosação em produtos cárneos são frequentemente aminas secundárias, parte das quais provém da oxidação excessiva de proteínas, e a outra parte é derivada das reações de ciclização e desaminação das aminas biogênicas presentes na carne (XIE, et al., 2023).

A formação das NAs em produtos de consumo humano e o risco gerado à saúde do consumidor requer que os órgãos reguladores estabeleçam limites para as concentrações das NAs.

2.3. Legislação

Sabendo do potencial carcinogênico das NAs, diferentes países e organizações estabeleceram limites máximos para os produtos cárneos processados. A Food and Drug Administration da China estipulou no GB 2762–2017 “*Contaminant Limits in Food Standards*” que o limite de NDMA é de $3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto que a Food and Drug Administration do Canadá estipula que a quantidade de NDMA não deve exceder $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos limita o conteúdo de NAs voláteis em produtos cárneos para $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (YAHAYA A. et al., 2020).

Num âmbito nacional, a legislação atual brasileira ainda não possui limites máximos para as NAs nesses produtos, todavia a RDC nº 272, de 14 de março de 2019 controla a quantidade de nitrito utilizado como conservantes em carnes, definindo como limite máximo de 0,015g a cada 100g. Esses limites têm o intuito de conter e minimizar a formação de NAs nesses produtos, visto que esses conservantes estão associados diretamente na quantidade de NAs formadas e, conseqüentemente, presente no produto final.

Com essas informações pode-se observar a existência de algumas lacunas na legislação nacional e global referentes a determinação de um nível permitido de NDEA em matrizes cárneas. Tal fato é preocupante visto que, assim como a NDMA, a NDEA também é uma das substâncias cancerígenas ativas com maior potencial de carcinogenicidade e genotoxicidade segundo classificação IARC, sendo que sua presença já foi quantificada por estudos nessa matriz por meio de diferentes métodos analíticos (ANDRADE et al., 2005; HUANG et al., 2013; RAZEMANI et al., 2015).

2.4. Métodos analíticos para determinação de NAs

Na década de 80, com a identificação de NDMA em produtos alimentícios e em bebidas, as pesquisas foram majoritariamente direcionadas para a determinação

de NAs voláteis. De modo geral, o preparo de amostras consistia na extração das NAs da matriz por vácuo, arraste de vapor, ou óleo mineral e destilação, e quantificação por cromatografia a gás com detector de quimioluminescência, conhecido como TEA (Thermal Energy Analyzer). Esse detector tem a vantagem de ser seletivo para o grupo N-N=O e até hoje é usado em alguns laboratórios. Por outro lado, a seletividade desse detector não permite aplicação abrangente e sendo assim muitos laboratórios optaram por empregar o espectrômetro de massas como detector (PENSABENE et al., 1882; AGLIO et al., 2022).

Nos últimos anos a comunidade científica tem explorado novas metodologias para a determinação de NAs em concentrações entre $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , geralmente empregando a cromatografia gasosa (GC) acoplada à análise de energia térmica (TEA) ou espectrometria de massa (MS) (RAZEMANI et al., 2015; HUANG et al., 2013; CAMPILLO et al., 2011), dessa forma gerando um aumento notável no número de artigos publicados na literatura científica e fomentando a discussão sobre esse tema. Todavia existe uma tendência a utilização do MS devido a identificação inequívoca dos analitos propiciada por este detector. Dessa forma, as metodologias empregadas frente às NAs estão baseadas no uso de equipamentos robustos, associados a preparos de amostra clássicos como extração líquido-líquido e extração sólido-líquido (HUANG et al., 2013).

Na Tabela 1 são apresentados alguns métodos da literatura para determinação de NAs em produtos cárneos.

Tabela 1. Técnicas da literatura para determinação de NAs em produtos cárneos.

Técnicas	Amostra	Analitos	LOD (ng g^{-1})	Referência
MAE-DLLME-GC-MS ^a	Salsichas e salames	NDMA, NDEA	0,45 0,32	RAZEMANI et al., 2015
D- μ -SPE-GC-CI-MS ^b	Produtos cárneos	NDMA, NDEA	0,12 0,06	HUANG et al., 2013
SPE-GC $\times$ GC-NCD ^c	Produtos cárneos	NDMA, NDEA	3,86 2,32	OZEL et al., 2010
HS-SPME-GC-TEA ^d	Salsicha	NDMA, NDEA	3,00 3,00	ANDRADE et al., 2005

^aExtração assistida por microondas e microextração dispersiva líquido-líquido acoplada a cromatografia gasosa – espectrometria de massa;

^bExtração dispersiva em fase micro sólida - cromatografia gasosa com espectrometria de massa de ionização química;

^cExtração em fase sólida - Cromatografia gasosa – detector de quimioluminescência de nitrogênio;

^dMicroextração em fase sólida headspace – cromatografia gasosa – analisador de energia térmica;

A maioria das técnicas da tabela 2 emprega detectores MS. Estes equipamentos são onerosos para aquisição e manutenção. Dessa forma, equipamentos com outros tipos de sistema de detecção podem trazer vantagens em termos de disseminação de metodologia em análises de rotina. Principalmente em promover o emprego de instrumentos convencionalmente disponíveis nos laboratórios de controle de qualidade das empresas, como o Cromatógrafo Gasoso com detector por ionização em chama (GC/FID). Este possui um custo de aquisição em manutenção muito inferior ao detector espectrômetro de massas, sendo o motivo de sua ampla disseminação nos laboratórios de análise.

Embora existam equipamentos disponíveis para permitir a separação e quantificação, a preparação de amostras ainda apresenta um grande desafio, pois o efeito da matriz pode dificultar a determinação dos analitos em baixas concentrações. Outra problemática envolvida a estas técnicas é o emprego de solventes orgânicos tóxicos em volumes não desprezíveis, dificultando o tratamento de resíduos e indo contra os preceitos da Química Verde.

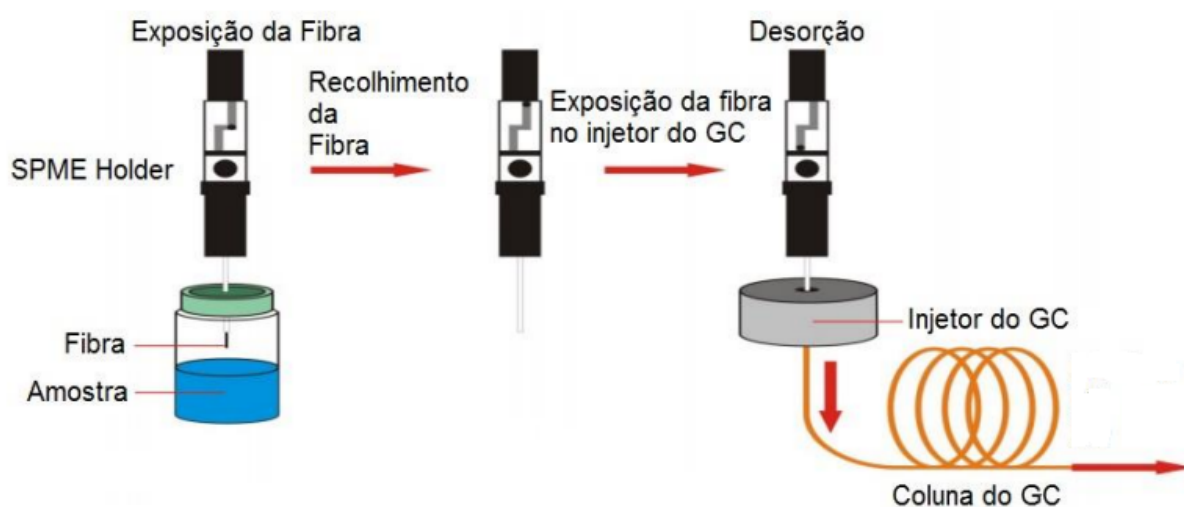
Para compensar a menor sensibilidade de detecção em equipamentos menos sensíveis, como o GC/FID, etapas de pré-concentração são necessárias antes da determinação de NAs. Além disso, devido à complexidade da matriz de amostra de produtos cárneos, o preparo de amostras também deveria minimizar os efeitos de matriz na determinação. Dentre as diferentes técnicas empregadas, destaca-se a microextração em fase sólida (SPME do inglês “*Solid Phase Microextraction*”) (TYHALI A. et al., 2022). A SPME tem o potencial para originar um método eficiente para a pré-concentração de NAs e limpeza da matriz das amostras antes da análise GC. Além disso, permite eliminar o uso de solventes orgânicos e requer menos etapas de processamento quando comparada com os métodos clássicos como extração líquido-líquido (LLE, do inglês “*Liquid-liquid Extraction*”).

2.5. Microextração em Fase Sólida no modo *headspace* e Cromatografia Gasosa com detecção por ionização em chama

O preparo de amostra miniaturizado baseado na SPME no modo *headspace* (HS) tem o potencial de ser um método eficiente para a extração de NAs antes da análise no GC/FID, pois tal método tem como vantagem o *clean up* muito eficiente, diferindo dos métodos clássicos. No modo HS/SPME é utilizado uma fibra de extração exposta ao HS, com isso não há interferências de compostos não voláteis da matriz da amostra e nem dos voláteis que não interajam com uma fibra extratora. Além disso, o modo HS permite uma extração isenta de solvente, o que torna a problemática do tratamento de resíduos menos impactante visto a baixa geração dos mesmos ao fim do processo, e como não emprega solventes orgânicos na extração, logo não haverá um pico de solvente no cromatograma, o que torna o cromatograma mais limpo (CALDAS et al, 2011).

A HS/SPME consiste basicamente em dois estágios como apresentado na Figura 3. No primeiro ocorre a adsorção dos compostos voláteis presentes no HS do frasco que contém a amostra, dessa forma promovendo a retenção do analito na fase estacionária. No segundo ocorre a dessorção térmica dos analitos no injetor do sistema de cromatografia a gás. (ZHANG; PAWLISZYN, 1993).

Figura 3. Etapas da microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS/SPME).



Fonte: Adaptado de (SCHMIDT; PODMORE, 2015)

No ponto de vista instrumental essa técnica é considerada simples, visto que se fundamenta no princípio físico-químico de sorção/dessorção, e se baseia na

cinética de transferência de massa e nos princípios termodinâmicos que descrevem o equilíbrio de partição do analito entre as fases (SHIROIWA, 2019).

A sorção ocorre em material presente em uma fibra. A fibra de SPME disponível comercialmente consiste de um suporte de sílica fundida com diâmetros na faixa próxima de 7 a 100 μm e comprimentos geralmente de 1 cm, podendo ser de 2 cm também, com revestimento de filme polimérico que torna a fibra mais flexível. A composição do filme polimérico da fibra pode ser composto por diferentes tipos se diferenciando de acordo com a polaridade, no intuito de ser seletivo na extração de analitos com diferentes polaridades. Para melhor manuseio, a fibra é conectada ao holder (Figura 3), o qual permite que a fase extratora seja exposta ao meio ou recolhida para dentro da agulha de aço inoxidável, dessa forma evitando danos na fibra ao perfurar a tampa do frasco ou septo do injetor do GC (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

Diferentes tipos de fibra de SPME podem ser utilizadas para a extração do analito, sendo que cada uma possui recomendações específicas como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Fibras comerciais para SPME e suas características.

Tipo de Fibra	Cor	Temperatura de Extração	Tipo de Analito	Massa Molar
Fibra de poliacrilato (PA) de 85 μm , polar	Cinza	280 °C	Polares e semi voláteis	80-300
Fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm , não polar	Vermelho	280 °C	Analitos voláteis	60-275
Fibra de PDMS de 30 μm , não polar	Dourado	280 °C	Não polares e semi voláteis	80-500

Fibra de PDMS-Carboxen(Car) DVB de 50/30µm,	Cinza	300 °C	Voláteis e semi voláteis	40-275
Fibra de PDMS-divinilbenzeno (DVB) de 65 µm	Roxo	300 °C	Analitos semi voláteis aromáticos	50–300
Fibra de Carbon Wide Range (WR)/ PDMS de 95 µm	Azul	300 °C	Gases e analitos altamente voláteis de baixa massa molecular	30-225

Fonte: Adaptado de (Supelco, 2023)

Para cada tipo de amostra, as condições de extração podem ser otimizadas de maneira a garantir melhores resultados. Vários parâmetros podem ser modificados para que haja a otimização do processo. O controle da temperatura da solução da amostra, por exemplo, auxilia na passagem dos analitos da fase líquida para o HS, aumentando a concentração de analitos no *headspace*, de maneira que o equilíbrio seja deslocado para a fase sólida, a fibra de SPME. Outro parâmetro ajustável é o tempo de exposição da fibra no HS, de maneira que haja o tempo necessário para que o sistema entre em equilíbrio. Mais um parâmetro que pode ser otimizado é a utilização de sal, promovendo o efeito *salting-out* para que a água possa solvatar os íons dissociados do sal e com isso os analitos volatilizam com maior facilidade (SHIROIWA, 2019).

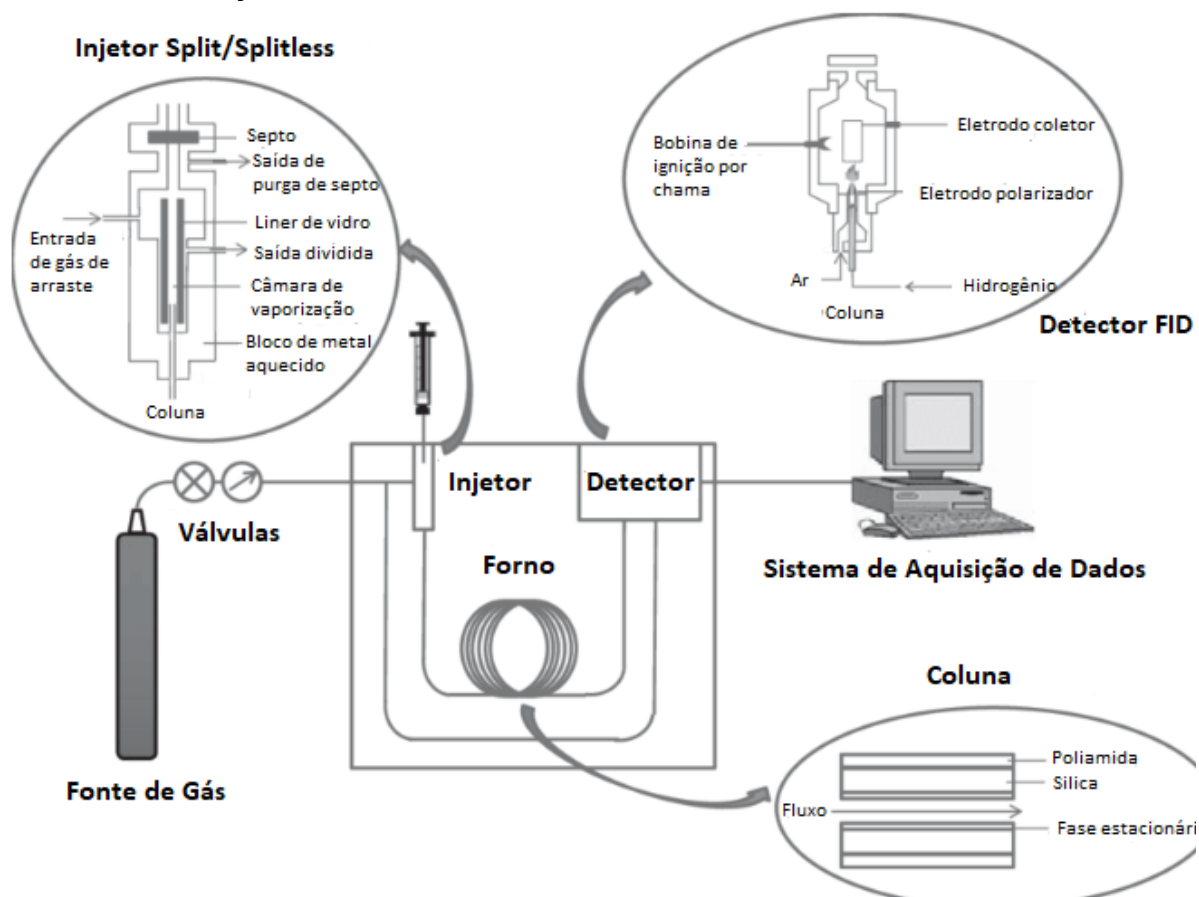
Ao realizar a comparação com outros métodos de extração a HS/SPME apresenta a vantagem de ser um processo analítico verde, pois não utiliza solventes para extração ou eluição. Além disso, tem custo relativamente baixo e é de fácil automatização, sendo muito empregada para a extração de compostos orgânicos a partir de distintas matrizes em diversos níveis de concentração. Da mesma forma, essa técnica permite a redução do número de etapas de análise, integrando etapas do processo analítico como amostragem, extração e concentração dos analitos.

Logo, torna-se especialmente adequada quando hifenada a métodos analíticos tais como a GC. (VAS; VÉKEY, 2004)

A combinação da extração HS/SPME com a técnica de GC/FID, pode permitir a geração de métodos analíticos com características únicas, associando a seletividade da extração com a simplicidade e robustez do sistema analítico. Além disso, essa combinação pode resultar em métodos com alta sensibilidade, ampla faixa de resposta linear e baixo ruído, vantagens essas consideradas muito importantes para a análise quantitativa.

Ao acoplar a HS/SPME com o GC, a fibra extratora contendo os analitos extraídos é introduzida no injetor do cromatógrafo (Figura 4) para ser misturada com o gás de arraste e ser arrastada para a coluna, onde são separadas de acordo com as interações com a fase estacionária da coluna e com a rampa de temperatura, e chegam ao sistema de detecção (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Os analitos eluem da coluna em tempos diferentes e são monitorados por um detector apropriado que gere resposta de acordo com suas características químicas. Um software permite realizar o controle dos parâmetros do equipamento e tratar os dados adquiridos.

Figura 4. Esquema de um equipamento de Cromatografia Gasosa acoplado com detector de ionização em chama.



Fonte: Adaptado de (SORIA, 2014)

Assim sendo, a HS-SPME e GC-FID combinados convergem com preceitos de acessibilidade na realização e aplicação das técnicas, principalmente no que tange a aquisição e manutenção do GC-FID, visto que tal equipamento possui um custo muito inferior ao ser comparado com as demais técnicas com detectores espectrômetros de massas em tandem. Além disso, é um sistema amplamente empregado em laboratórios de controle de qualidade.

Já conhecendo o funcionamento e as vantagens do método a ser utilizado é necessário realizar a validação do mesmo no intuito de legitimar o uso dessa metodologia proposta.

2.6. Validação de método

Milhões de testes, medições e exames são feitos todos os dias em milhares de laboratórios ao redor do mundo. Praticamente todos os aspectos da sociedade

são apoiados de alguma forma pelo trabalho analítico. O custo de realização dessas medições é alto e custos adicionais podem surgir de decisões tomadas com base nos resultados. Por exemplo, testes que mostrem alimentos impróprios para consumo podem resultar em pedidos de indenização; testes confirmando a presença de drogas proibidas em produtos cárneos comerciais podem resultar em multas, prisão ou mesmo, em alguns países, execução. Obviamente, é importante fazer uma medição correta e ser capaz de mostrar que o resultado está correto.

A validação do método é um requisito importante na prática da análise química. A validação do método é basicamente o processo de definir um requisito analítico e confirmar que o método em consideração possui recursos consistentes com o que a aplicação exige. Inerente a isso está a necessidade de avaliar o desempenho do método. (EURACHEM, 2014)

Dentre os parâmetros de validação que merecem atenção pode-se destacar a seletividade, linearidade, exatidão, precisão e os limites de detecção e quantificação.

A seletividade analítica está relacionada com a medida que o método pode ser usado para determinar analitos particulares em misturas ou matrizes sem interferências de outros componentes de comportamento semelhante (IUPAC, 2001). Em geral, na etapa de medição do método analítico é preciso certificar que a propriedade medida é apenas do analito e não há algo quimicamente ou fisicamente semelhante na matriz da amostra, dessa forma surgindo como uma coincidência causando assim interferências que podem causar um viés ao aumentar ou diminuir o sinal atribuído no resultado da medição.

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada pelo método em um nível de confiança especificado. Enquanto o limite de quantificação (LOQ) estabelece o menor nível em que o desempenho é aceitável para uma aplicação típica (EURACHEM, 2014). Dessa forma, para o método proposto ser aplicável e confiável o mesmo deve apresentar LOD e LOQ menor que os limites impostos pelas legislações citadas anteriormente.

Dados os fatos, após validado, a técnica HS-SPME-GC-FID permitirá extrair a NDMA e a NDEA de forma mais econômica e verde, solucionando problemáticas atuais e possibilitando a comparação da sensibilidade do novo método em relação aos métodos descritos na literatura (ANDRADE et al., 2005; HUANG et al., 2013; RAZEMANI et al., 2015), dessa forma analisando a eficácia em relação a sensibilidade do método e a reprodutibilidade do mesmo.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver um método analítico para determinação de N-Nitrosodimetilamina e N-Nitrosodietilamina em salsichas utilizando microextração em fase sólida no modo *HeadSpace* acoplada a cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama..

3.2. Objetivos Específicos

- Otimizar os parâmetros de separação cromatográfica da NDMA e NDEA no GC/FID.
- Otimizar os parâmetros de preparo de amostra por HS/SPME para extração de NDMA e NDEA incluindo tipo de fibra, pH, força iônica, uso de ultrassom, temperatura e tempo de extração;
- Validar o método HS/SPME-GC/FID para determinação de NDMA e NDEA incluindo os parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação;
- Aplicar o método em amostras de salsicha comerciais para investigar a presença de NDMA e de NDEA.

4. Metodologia

4.1. Padrões, reagentes e materiais

Os padrões analíticos N-Nitrosodimetilamina (NDMA) e N-Nitrosodietilamina (NDEA) da Sigma-Aldrich foram empregados nas análises. Uma solução estoque de cada NA foi preparada (1000 mg L^{-1}), e uma solução de trabalho de 500 mg L^{-1} foi preparada por diluição apropriada da solução estoque em metanol (grau HPLC da VETEC), sendo armazenada a 4°C até o momento da análise.

A água ultrapura foi obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) e utilizada ao longo deste estudo. O cloreto de sódio obtido da Fisher Scientific foi utilizado para os ensaios de força iônica.

Para os estudos do efeito do pH foram utilizadas soluções preparadas no dia das análises. O pH 2,0 e 10,0 foram ajustados adicionando sucessivas gotas de soluções estoque $1,0 \text{ M}$ de ácido clorídrico e hidróxido de sódio em água ultrapura, respectivamente, aferindo o pH em pHmetro.

As fibras SPME revestidas com polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS/DVB, $65 \mu\text{m}$), Polidimetilsiloxano-Carboxen-Divinilbenzeno (PDMS/Car/DVB, $50/30\mu\text{m}$) e poliacrilato (PA, $85 \mu\text{m}$) adquiridas da Supelco (Sigma Aldrich®) foram empregadas com dispositivo manual de SPME (holder) obtido da Supelco (Sigma Aldrich®) para extrair os analitos da amostra. As fibras foram condicionadas antes do uso de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, inserindo no injetor do GC à 250°C com split 1:100 durante 1h.

As amostras de salsicha empregadas nos estudos de otimização e validação foram obtidas em comércio local em Florianópolis.

4.2. Instrumentação

Um GC modelo 7890A da Agilent Technologies® (EUA) equipado com injetor split/splitless e detector FID foi utilizado com os gases de alta pureza (nitrogênio, hidrogênio e ar sintético) obtidos da White Martins.

O preparo do extrato de salsicha utilizado como amostra foi realizado com um T 18 digital ULTRA-TURRAX® da IKA.

As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro Quimis, modelo Q400MT com eletrodo de referência de Ag/AgCl.

Para manter o aquecimento e agitação das amostras durante as extrações, foi empregado um banho termostatizado da Sieger, modelo Stern 6 com controlador de temperatura, acoplado com mangueiras em uma cela de vidro sobre chapa de agitação magnética da Velp Scientifica, modelo Arec.

Para os estudos do uso de ultrassom no preparo de amostra foi utilizado um ultrassom da Unique Ultrasonic Cleaner, modelo USC 450.

4.3. Preparo de amostra

Foi transferido 50 g de matriz cárnea (salsicha) para um béquer de 250 mL e adicionado 200 mL de água ultrapura. A mistura foi triturada com auxílio do Ultra Turrax por 4 min, obtendo um extrato de salsicha. Este extrato foi transferido e avolumado em balão volumétrico de 250 mL. O extrato gerado era armazenado a 8 °C em geladeira e utilizado em até 5 dias, após esse período era preparado um novo extrato e realizado o descarte corretamente do anterior. Os extratos de salsicha foram empregados em todos os ensaios de otimização, validação e aplicação em amostras de carne do método analítico HS/SPME-GC/FID.

4.4. Otimização do método cromatográfico via GC/FID

Para a separação cromatográfica da NDMA e NDEA no GC/FID foi utilizada a coluna DB-Wax (Polietilenoglicol; 30 m, 0,18 mm, 0,14 µm). A injeção ocorreu pelo modo splitless. O controle e aquisição dos dados foram realizados utilizando o software Chemstation®. A vazão do gás de arraste foi de 6 mL min⁻¹ composto por gás nitrogênio de alta pureza (White Martins®, 99,999%). A temperatura do injetor foi de 250 °C. O programa de temperatura iniciou em 50 °C, depois foi aumentado em uma taxa de 15 °C por min até 100 °C, mantendo por 1 min, em seguida aumentando a temperatura a uma taxa de 25 °C por min até 230 °C, dessa forma, totalizando uma corrida cromatográfica de 8,2 min. A temperatura do FID foi de 320 °C.

4.5. Otimização do preparo de amostra HS-SPME

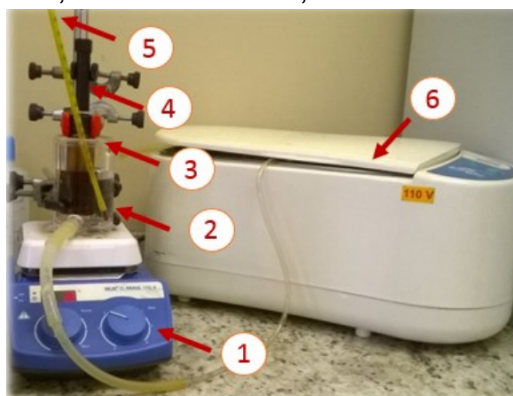
4.5.1. Método de extração das NAs do extrato via HS/SPME.

Para todos os ensaios de otimização, os parâmetros foram fixados conforme a descrição abaixo.

Foi transferido 5,0 mL do extrato de salsicha para um vial de 20 mL, no qual foi adicionado uma pequena barra de agitação, uma solução padrão do mix contendo NDMA e NDEA em uma concentração final de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ e 1,5 g de cloreto de sódio. O frasco foi tampado e colocado no ultrassom por 10 min, após esse tempo, o frasco foi disposto em banho termostatizado à 35°C sob agitação (250 rpm) por 10 min para alcançar o equilíbrio termodinâmico. A fibra a ser testada foi exposta no HS durante 60 min para a extração das NAs. Após este período de exposição da fibra no HS, a mesma foi submetida a etapa de dessorção térmica no injetor do GC/FID à 250°C .

Na Figura 5 observa-se o sistema montado para controle da agitação e temperatura durante a extração das NAs na amostra, no qual há o auxílio do suporte universal e garras para fixar o holder e a fibra no HS do frasco durante a extração das NAs.

Figura 5. Sistema para o preparo de amostra HS/SPME. Legenda da imagem: 1 - Agitador magnético, 2 - Cela de vidro conectada com mangueiras ao banho termostatizado, 3 – Frasco de vidro de SPME com amostra, 4 – Holder com a fibra no HS do frasco da amostra, 5 – Termômetro, 6 – Banho termostatizado.



Fonte: (TAVARES, 2020).

4.5.2. Seleção de fibra

A seleção da fibra foi feita fixando os parâmetros de extração no ensaio de extração da NDEA e NDMA em extrato de salsicha descrito no item 4.5.1. Foram

avaliadas as fibras comerciais de PDMS/DVB, PDMS/Car/DVB e PA pelo método HS/SPME-GC/FID, a fim de avaliar o potencial de extração das fibras frente a NDMA e NDEA. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada fibra. Foi realizada a normalização das áreas obtidas dos picos cromatográficos das NAs a fim de obter um gráfico de barras pelo software *Microsoft Excel*® 2016.

4.5.3 Ultrassom

Empregando a fibra que apresentou a melhor extração das NAs, no caso a PDMS/Car/DVB, e fixando os demais parâmetros de análise conforme disposto no item 4.5.1, foi estudado a influência do emprego do ultrassom por 10 minutos no potencial de extração. Os ensaios foram realizados em triplicata. Foi realizada a normalização das áreas obtidas das NAs a fim de obter um gráfico de barras pelo software *Microsoft Excel*® 2016.

4.5.4 Seleção de pH

Empregando a fibra que apresentou a melhor extração das NAs, removendo o uso do Ultrassom e fixando os demais parâmetros de análise conforme disposto no item 4.5.1 foi feito o estudo do pH na extração. Os pHs estudados foram de 2,0, 7,0 e 10,0 empregando as soluções aquosas ajustadas com HCl para o pH 2,0 e NaOH para o pH 10. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada pH. Foi realizada a normalização das áreas obtidas das NAs a fim de obter um gráfico de barras pelo software *Microsoft Excel*® 2016.

4.5.5 Otimização multivariada

As variáveis temperatura de extração (20 - 60 °C), tempo de extração (30 - 120 min) e força iônica pela adição de NaCl na amostra (0 a 30%, m v⁻¹) foram otimizadas através de um planejamento multivariado do composto central, totalizando 17 experimentos. O planejamento está descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Planejamento do composto central para a otimização da temperatura de extração, tempo de extração e % de NaCl adicionado à amostra na extração via HS/SPME.

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Força iônica (%)
1	28	48	6
2	28	102	24
3	52	48	24
4	52	102	6
5 (C)	40	75	15
6	28	48	24
7	28	102	6
8	52	48	6
9	52	102	24
10 (C)	40	75	15
11	20	75	15
12	60	75	15
13	40	30	15
14	40	120	15
15	40	75	0
16	40	75	30
17 (C)	40	75	15

Fonte: (TAVARES, 2020)

Cada ensaio do planejamento do composto central foi realizado empregando a fibra e o pH que apresentou a melhor extração das NAs, removendo o uso do Ultrassom e mantendo-se fixo os parâmetros do procedimento citado no tópico 4.5.1, porém adicionando-se o NaCl na amostra entre 0 a 30% ($m\ v^{-1}$) de NaCl, com a concentração final de $5\ mg\ L^{-1}$ das NAs e variando o tempo e a temperatura de extração para cada experimento. As superfícies de resposta para as três variáveis foram obtidas através do tratamento da média geométrica das áreas das NAs pelo software Statistica® 13.0.

4.6 Método HS/SPME-GC/FID otimizado

A técnica otimizada de HS/SPME-GC/FID para determinação das NAs em salsicha consistia em transferir 5 mL do extrato preparado com o auxílio de um Ultra Turrax para um frasco de 20 mL. Após isto, adiciona-se ao frasco uma pequena barra de agitação e 1,5 g de cloreto de sódio. O frasco foi tampado e disposto em banho termostaticado à 35 °C sob agitação (250 rpm) por 10 min para alcançar o equilíbrio termodinâmico. A fibra PDMS/Car/DVB foi exposta no HS durante 60 min

para a extração das NAs. Após este período de exposição da fibra no HS, a mesma foi submetida a etapa de dessorção térmica no injetor do GC/FID à 250 °C, por 5 min. A fibra foi previamente condicionada por 60 min a 250 °C antes de cada ensaio.

4.7 Validação do método HS/SPME-GC/FID otimizado

O método HS/SPME-GC/FID otimizado foi validado avaliando os parâmetros analíticos conforme preconiza o guia de validação Q2 (R1) do ICH (2006). Entre os parâmetros a serem avaliados, foi obtida a curva de calibração em 7 níveis empregando matriz isenta na faixa de trabalho de 0,10 - 1,5 mg kg⁻¹ em triplicata, sendo a linearidade avaliada em termos do coeficiente de determinação. Foi analisado em triplicata o branco e não foram encontrados níveis detectáveis do analito.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram obtidos pela razão sinal/ruído com base da área do pico.

Foi avaliada a exatidão através da recuperação relativa (RR). Preparou-se amostras em três níveis de concentração da curva (0,10; 0,75 e 1,50 mg kg⁻¹). Após sua análise e cálculo de concentração obtido através da curva de calibração, fez-se o cálculo de recuperação através da razão entre a concentração média experimental e concentração teórica, multiplicado por 100.

Foi avaliada a precisão intra-dia em três pontos da curva (0,10; 0,75 e 1,50 mg kg⁻¹) sendo a extração realizada três vezes em cada ponto (n = 3). Para estudos de precisão inter-dia, a concentração de 0,75 mg kg⁻¹ foi selecionada para realizar três repetições em três dias diferentes (n = 9). O desvio padrão relativo (RSD) foi utilizado para avaliar a repetitividade dos ensaios pelas precisões intra-dia e inter-dia como também nos ensaios de RR.

4.8 Aplicação do método HS/SPME-GC/FID em produto cárneo

Após a otimização do preparo de amostra HS/SPME e a validação do método HS/SPME-GC/FID, foi realizada a aplicação do mesmo para a matriz cárnea em duas amostras de diferentes marcas e lotes de produtos comerciais de salsichas. As amostras foram adquiridas em diferentes comércios locais da cidade de Florianópolis.

As amostras comerciais utilizadas nessa etapa foram armazenadas a 8 °C em geladeira até o momento das determinações. Todos os ensaios de determinação das NAs nas amostras foram realizados em triplicata.

4.9 Segurança no laboratório

Ao longo de todos os procedimentos laboratoriais foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPI) adequados para o que estava sendo realizado, como jaleco, luvas, calçados fechados e uso de calças. As soluções foram preparadas em capela com o exaustor ligado para evitar contaminações, principalmente na adição dos padrões analíticos das NAs. Os resíduos produzidos foram armazenados em recipientes apropriados, até que a equipe de coleta de resíduos fosse coletá-los. Os materiais descartáveis como luvas e ponteiros foram descartados no recipiente para resíduos sólidos e armazenados para recolhimento e destinação pela equipe de coleta de resíduos da UFSC.

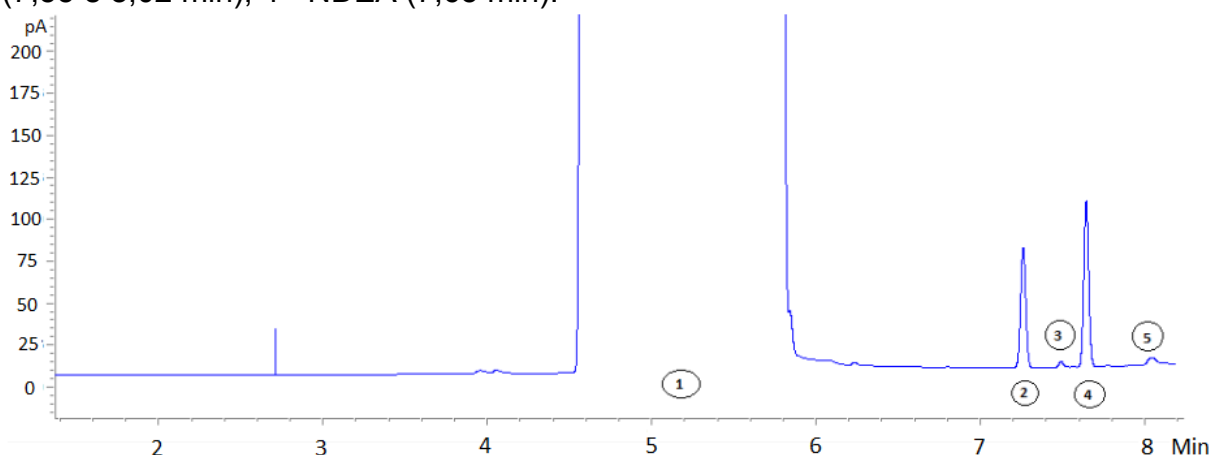
5. Resultados e discussões

5.1. Análise via HS/SPME-GC/FID

5.1.1. Otimização do método cromatográfico via GC/FID

Na primeira etapa dos ensaios foi realizada a separação cromatográfica das NAs, seguindo as condições cromatográficas descritas no item 4.4. Para observar a separação dos analitos, foram empregados padrões analíticos individuais e misturados dos compostos NDMA e NDEA, realizando a injeção direta das soluções dos padrões em metanol. Primeiramente, observou-se o tempo de retenção de cada composto individualmente e posteriormente observou-se a separação obtida pela injeção da solução contendo a mistura dos compostos (Figura 6).

Figura 6. Separação cromatográfica da NDMA e NDEA, ambas a 25 mg L^{-1} , em metanol. Legenda: 1 - MeOH (5,21 min), 2 - NDMA (7,26 min), 3 e 5 - Interferentes (7,55 e 8,02 min), 4 - NDEA (7,65 min).



Fonte: Dados obtidos no software *Chemstation*® (2023).

Na Tabela 4 apresenta-se alguns parâmetros obtidos que evidenciam a eficiência da separação cromatográfica das NAs com as condições cromatográficas estabelecidas inicialmente para o método HS/SPME-GC/FID.

Tabela 4. Parâmetros de separação cromatográfica das NAs em injeção direta de 25 mg L⁻¹ de NDMA e NDEA para o método HS/SPME-GC/FID.

Parâmetro de eficiência	N-Nitrosamina	
	NDMA	NDEA
Tempo de retenção (min)	7,26	7,65
Fator de retenção (k')	0,815	0,912
Simetria de picos	0,948	0,946
Números de pratos (N/m)	2432	2992
Resolução	5,88	

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O fator de retenção, calculado de acordo com a equação $k' = (t_R - t_M) / t_M$, em que t_M é o tempo morto fornecido em min e t_R é o tempo de retenção do analito fornecido em min, está relacionado à velocidade com a qual o soluto migra através da coluna. Idealmente, as separações são realizadas sob condições nas quais os fatores de retenção para os solutos na mistura situam-se na faixa de 1 a 5, dessa forma e o $k' < 1$ a eluição é muito rápida e poderia haver sobreposição de sinais, e se $k' > 5$ a eluição é muito lenta, o que alargaria os sinais (SKOOG, WEST, HOLLER, 2009).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4, os valores de k' foram inferiores a 1 e indicam que a eluição é rápida, entretanto não apresenta sobreposição de sinais, como pode ser observado na Figura 6.

A simetria de pico calculada pelo software *Chemstation*® mostra que os valores obtidos estão muito próximos de 1 para ambos os picos, dessa forma apresentando picos perfeitamente simétricos, sem a formação de caudas, possibilitando assim a integração dos picos a fim de realizar os ensaios posteriores.

O número de pratos calculados de acordo com a equação $N = 16 (t_R / w)^2$, em que t_R é o tempo de retenção do analito fornecido em min e w é a largura da linha de base do pico, nas mesmas unidades t_R , avalia a eficiência da coluna na separação cromatográfica, sendo que quanto maior o número de pratos, mais eficiente a coluna, pois tem mais estágios de equilíbrios do composto entre a coluna e a fase estacionária e maior o tempo de retenção e menor a largura da base do pico, obtendo picos mais finos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Sabendo disso pode-se concluir que o número de pratos superior a 2000 em ambos os analitos indicou que a coluna utilizada foi eficiente para a aplicação do método.

A Resolução (R_s) calculada como: $R_s = 2 (t_n - t_{n-1}) / (w_n + w_{n-1})$, em que t é o tempo de retenção do pico fornecido em min e w é a largura da linha de base do pico, nas mesmas unidades t_R é um parâmetro que descreve a habilidade de uma coluna em separar 2 componentes. Ao analisar o valor obtido de resolução e ao analisar visualmente a separação dos picos na Figura 6 observa-se que há separação dos picos na linha de base, sendo possível integrar os picos para realizar os ensaios posteriores (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A separação cromatográfica observada no cromatograma da Figura 6, onde o tempo de retenção do NDMA é 7,26 min e do NDEA é 7,65 min ao empregar a coluna DB-Wax no GC/FID, indicou a boa resolução dos picos cromatográficos e a viabilidade do uso deste sistema de detecção no método de análise deste trabalho.

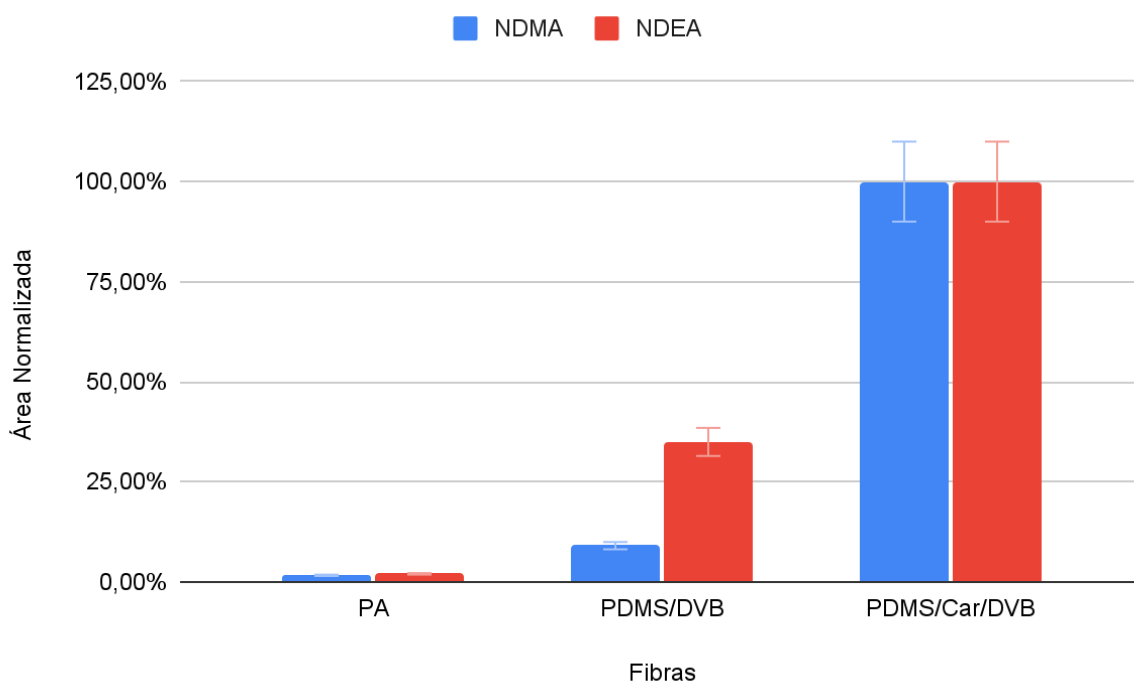
5.1.2. Otimização do preparo de amostra HS/SPME

5.1.2.1. Seleção de fibra

A seleção da fibra foi realizada univariadamente, sendo uma etapa importante para avaliar a afinidade dos compostos analisados com as características de revestimento das fibras estudadas. Neste estudo, foi avaliado o potencial de extração pelo método HS/SPME-GC/FID empregando-se três diferentes fibras comerciais: PDMS/Car/DVB, PDMS/DVB e PA.

Abaixo segue o resultado obtido nesta etapa avaliando-se a área normalizada de cada NA para cada fibra (Figura 7).

Figura 7. Gráfico das áreas de sinal normalizadas para NDMA e NDEA com as diferentes fibras comerciais (PA, PDMS/DVB e PDMS/Car/DVB).



Fonte: Elaborado pelo autor no software *Microsoft Excel® 2016* (2023).

Na Figura 7 pode-se observar que das fibras utilizadas a que possui melhor potencial de extração é a fibra mista PDMS/Car/DVB para o NDEA a 5 mg Kg^{-1} , enquanto a fibra PA apresenta o pior potencial, obtendo baixos valores de área de picos dos analitos estudados, enquanto a fibra PDMS/DVB, por sua vez, apresenta potencial intermediário comparados às demais fibras aplicadas.

Esse resultado pode ser explicado de acordo com as diferentes polaridades das fibras frente a alta polaridade nas NAs, sendo que a fibra mista de PDMS/Car/DVB possui maior afinidade com compostos mais polares do que as outras duas fibras, e o PA é o menos polar, como pode ser observado na Tabela 2. A polaridade das fibras frente a maior interação com as NAs pode ser descrita na ordem:

$$\text{PA} < \text{PDMS/DVB} < \text{PDMS/Car/DVB}$$

Embora as fibras testadas tenham extraído ambas NAs estudadas, para a NDEA houve maior eficiência na extração ao obter-se picos de maior intensidade em comparação a NDMA, isso pode estar relacionado a menor afinidade da NDMA com os revestimentos das fibras testadas. Com isso, a fibra PDMS/Car/DVB apresentou

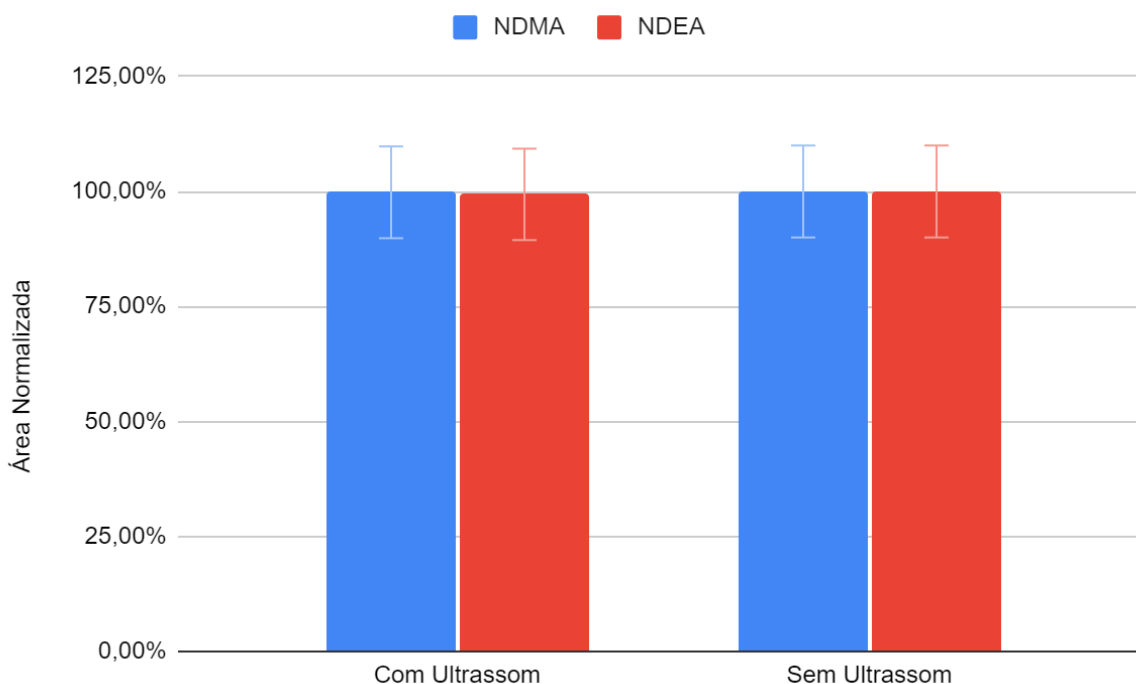
maior eficiência para a extração das NAs, sendo esta empregada nos ensaios posteriores.

5.1.2.2. Ultrassom

A otimização do uso de ultrassom foi realizada univariadamente, mantendo fixa as condições descrita no item 4.5.1, para avaliar se o uso desse equipamento melhoraria a volatilização dos analitos e, conseqüentemente, aumentaria o potencial de extração pelo método HS/SPME-GC/FID.

Abaixo segue o resultado obtido nesta etapa avaliando-se a área normalizada de cada NA para as extrações com e sem utilização de ultrassom por 10 min. (Figura 8).

Figura 8. Gráfico das áreas normalizadas da NDMA e NDEA com e sem uso de ultrassom por 10 min.



Fonte: Elaborado pelo autor no software *Microsoft Excel®* 2016 (2023).

Ao comparar a área normalizada das NAs, observa-se que a alteração do uso de ultrassom não teve influência no potencial de extração das NAs, já que a diferença percentual da área entre estes dois métodos é menor que 2%. Dessa forma, o ultrassom não foi utilizado nas extrações. Isso resultou em uma redução de

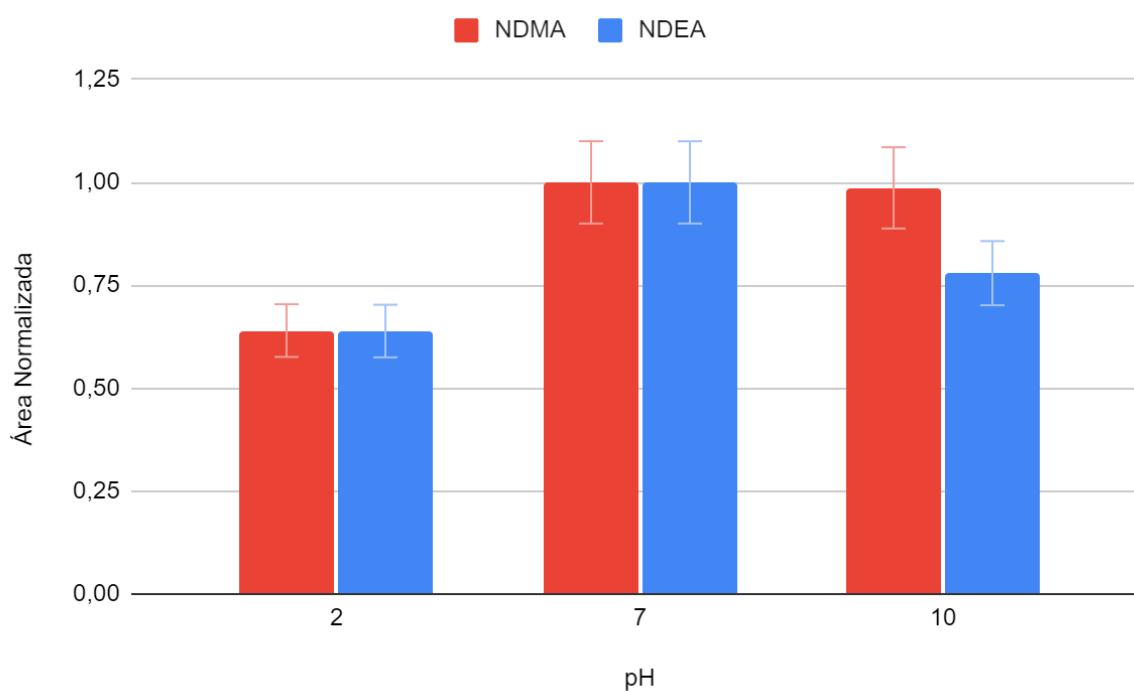
10 min na etapa de extração tornando o método mais rápido sem perder a efetividade.

5.1.2.3. Seleção do pH

A seleção do pH foi realizada univariadamente, mantendo fixa as condições descritas no item 4.5.1. Esta seleção é uma etapa importante para avaliar o potencial de extração dos compostos analisados pelo método HS/SPME-GC/FID, e para isto as amostras foram analisadas em três pHs diferentes, sendo eles 2,0, 7,0 e 10,0, correspondendo respectivamente ao caráter ácido, neutro e básico.

Abaixo segue o resultado obtido nesta etapa avaliando-se a área normalizada de cada NAs para cada pH utilizado (Figura 9).

Figura 9. Gráfico das áreas normalizadas das NAs em diferentes pH utilizados.

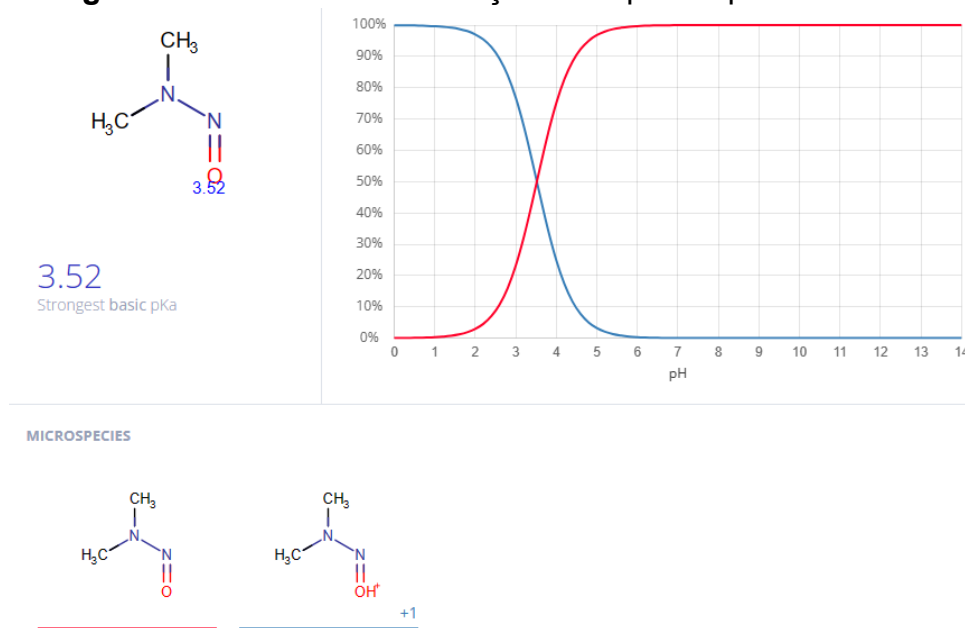


Fonte: Elaborado pelo autor no software *Microsoft Excel® 2016* (2023).

Na Figura 9 pode-se observar que na faixa aplicada o pH que possui o melhor potencial de extração é o pH 7, enquanto que no pH em meio básico apresenta dados semelhantes de extração para a NDMA e abaixo para a NDEA, e o pH em meio ácido possui o menor potencial de extração apresentando picos cromatográficos menos intensos em relação aos demais pHs estudados.

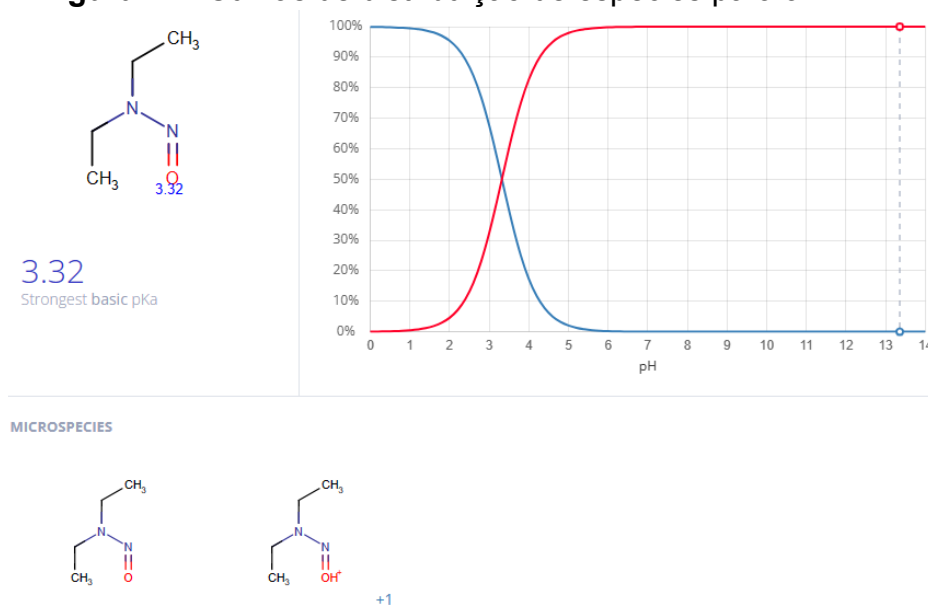
Ao analisar a curva de distribuição de espécies da NDMA e NDEA, observa-se que o pH neutro e básico fez com que as NAs adquiram uma estrutura não iônica (Figuras 10 e 11.), dessa forma a transferência de massa dos NAs para o HS poderia ocorrer mais facilmente. No entanto, a eficiência do procedimento de extração diminuiu ligeiramente, quando o valor do pH diminui, isso ocorre devido ao fato das NAs apresentarem uma estrutura iônica (RAZEMANI et al, 2015).

Figura 10. Curvas de distribuição de espécies para a NDMA.



Fonte: Elaborado pelo autor no software *Chemaxon*®

Figura 11. Curvas de distribuição de espécies para a NDEA.



Fonte: Elaborado pelo autor no software *Chemaxon*®

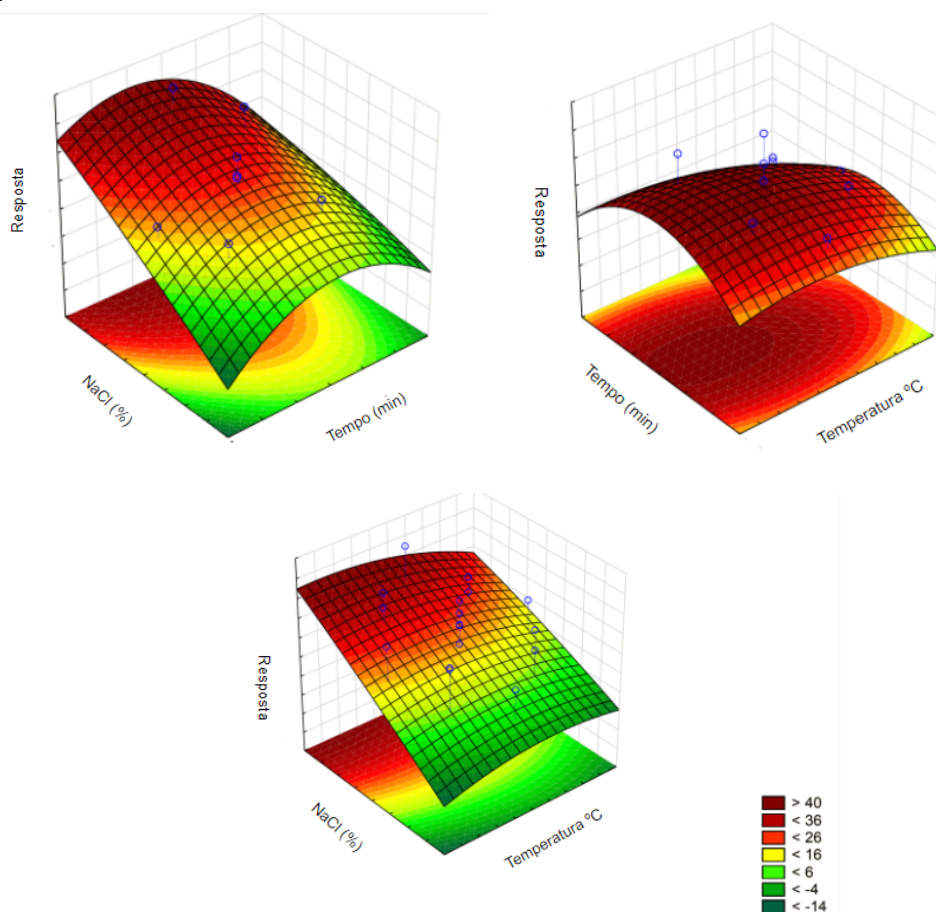
Neste estudo optou-se por analisar apenas a diferença entre a solução ser ácida, básica ou neutra de forma mais abrangente, visto a demanda de material necessário e o tempo disponível para tal seleção.

De forma geral, o pH 7 demonstrou maior favorecimento na extração das NAs pela fibra, e com isso este foi empregado nos ensaios posteriores deste projeto.

5.1.2.4. Otimização multivariada

A avaliação do efeito das variáveis força iônica, temperatura e tempo de extração foram estudadas neste trabalho simultaneamente através da aplicação do método de análise multivariada com o planejamento composto central a fim de observar qual condição que promove uma maior extração das NAs da salsicha fortificada. Através desse planejamento foram obtidas as superfícies de resposta apresentadas na Figura 12.

Figura 12. Superfícies de resposta obtidas através do planejamento composto central para otimização da temperatura, tempo de extração e % de NaCl na extração das NAs.



Fonte: Dados obtidos no software Statistica® 13.0 (2023).

Em relação ao ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático linear, observa-se que o coeficiente de correlação (R) igual a 0,756, obtido pela Tabela ANOVA (Tabela 5) indica que 75,6% dos dados estão ajustados pelo modelo matemático linear.

Tabela 5. Tabela ANOVA do planejamento do composto central para extração das NAs no método HS/SPME-GC/FID.

Fator	SS	df	MS	F	P
Temperatura	135,852	1	135,8524	3,45548	0,204138
Temperatura (°C)(Q)	22,247	1	22,2468	0,56586	0,530389
Tempo de extração (min)(L)	2,626	1	2,6263	0,06680	0,822019
Tempo de extração (min)(Q)	141,265	1	141,2645	3,59314	0,198489
Força iônica (%) (L)	780,859	1	780,859	19,8616	0,046839
Força iônica (%) (Q)	1,087	1	1,0871	0,02765	0,883224
1L by 2L	4,337	1	4,3365	0,11030	0,771378
1L by 3L	13,133	1	13,1328	0,33404	0,621692
2L by 3L	16,160	1	16,1596	0,41103	0,587109
Lack of Fit	276,643	5	55,3285	1,40731	0,464951
Pure Error	78,630	2	39,3150		
Total SS	1459,446	16			

Fonte: Dados obtidos no software Statistica® 13.0 (2023).

Conforme os valores de p na Tabela da ANOVA (Tabela 5), observa-se a significância de cada parâmetro avaliado. A variável força iônica se demonstrou significativa com $p < 0,05$, causando grande efeito na extração das NAs, portanto, a condição ideal para a extração é uma concentração de 30% de NaCl adicionado, ou seja uma solução saturada, devido ao favorecimento do efeito *salting-out*, que aumenta a partição dos analitos orgânicos da amostra aquosa para o HS (HARTMANN; MCNAIR; ZOECKLEIN, 2002).

Os parâmetros tempo e temperatura, pelo modelo linear na Tabela ANOVA (Tabela 5), apresentam valores de $p > 0,05$. Estes valores indicam que estes parâmetros são menos significativos do que o teor de NaCl nas extrações das NAs na salsicha. Os valores ótimos destes parâmetros foram estimados pelo gráfico de superfície de resposta (Figura 12) baseando-se no maior teor de NaCl e maior resposta destes dois parâmetros, sendo selecionado o tempo de 60 min a uma temperatura de 35 °C para a validação do método.

5.2. Validação do método HS/SPME-GC/FID

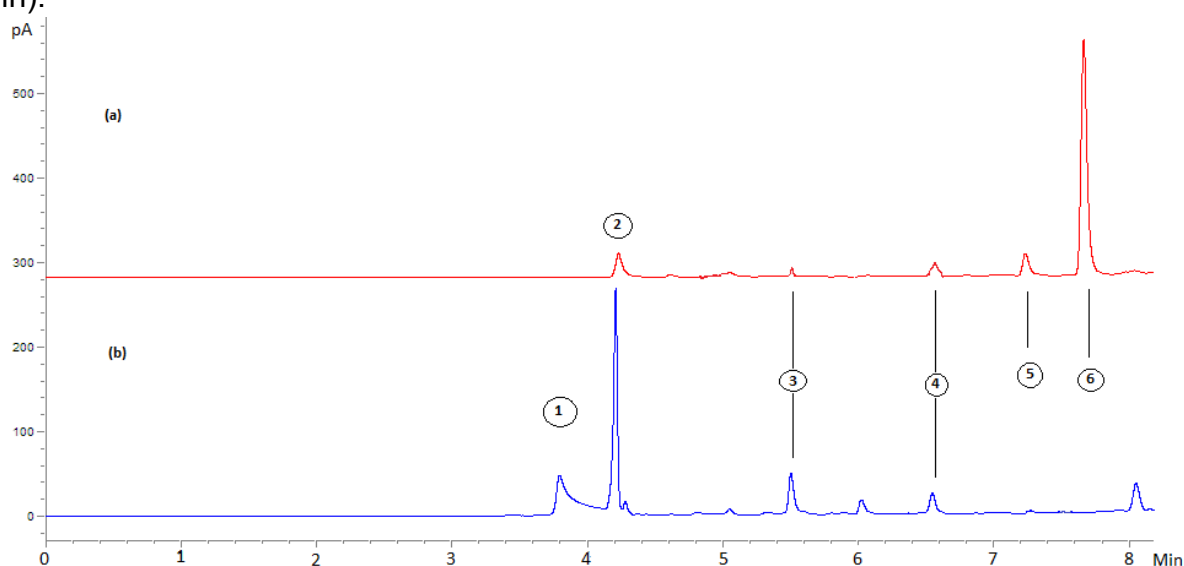
Após a otimização das variáveis estudadas no método, selecionando as condições experimentais com maior potencial de extração das NAs em salsicha, o método HS/SPME-GC/FID otimizado foi validado para determinar a NDMA e NDEA.

Para isso, foram avaliados os parâmetros analíticos que revelam os atributos quantitativos da técnica, sendo estes a seletividade, a linearidade, a precisão, a exatidão, e os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ).

Em todos os estudos de validação do método foram empregados como matriz isenta o extrato de salsicha, ou seja, matriz que não continha os analitos antes de submetê-la a fortificação com os padrões.

O primeiro item a ser validado foi a seletividade do método, sendo realizada através da comparação do cromatograma da matriz com adição dos padrões da NDEA e NDMA e com o da matriz isenta (Figura 13). Neste sentido, foi avaliado se a matriz é realmente isenta, pois com as mudanças nos parâmetros do HS/SPME durante a otimização, e a consequente melhora nas condições de extrações das NAs presentes na salsicha, impurezas podem ter ganhado evidência no cromatograma.

Figura 13: Cromatograma comparativo entre a matriz de salsicha fortificada com 5 mg Kg⁻¹ de NDMA e NDEA (a) e a matriz de salsicha isenta (b). Legenda: 1, 2, 3, e 4 - Interferentes (3,83; 4,22; 5,54 e 6,58 min), 5 - NDMA (7,22min), 6 - NDEA (7,65 min).



Fonte: Dados obtidos no software Chemstation®(2023).

Os demais parâmetros analíticos de mérito, incluindo a linearidade, a precisão intra-dia e inter-dia, que estão relacionados à repetitividade de análises no mesmo dia e à precisão intermediária pelas análises feitas em dias diferentes, a exatidão pela recuperação relativa e os limites de detecção e quantificação, estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros analíticos do método otimizado para a determinação de NDMA e NDEA por HS/SPME-GC/FID.

Parâmetros analíticos	n	NDMA	NDEA
Linearidade (mg Kg^{-1}) ^a	7	0,10 - 1,50	0,10 - 1,50
Coeficiente Angular ^a	7	1,72	24,6
Coeficiente Linear ^a	7	- 0,137	13,3
Coeficiente de determinação (R^2) ^a	7	0,971	0,964
LOD ^b ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	3	38	4
LOQ ^b ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	3	156	14
RR% (RSD, %) ^c 0,10 mg Kg^{-1}	3	111,5 (11,01)	101,6 (10,64)
RR% (RSD, %) ^c 0,75 mg Kg^{-1}	3	98,2 (8,72)	92,3 (11,80)
RR% (RSD, %) ^c 1,50 mg Kg^{-1}	3	99,1 (10,64)	96,7 (2,55)
Precisão Intra-dia (RSD, %) ^d 0,10 mg Kg^{-1}	3	11,01	10,64
Precisão Intra-dia (RSD, %) ^d 0,75 mg Kg^{-1}	3	8,72	7,54
Precisão Intra-dia (RSD, %) ^d 1,50 mg Kg^{-1}	3	12,70	2,55
Precisão Inter-dia (RSD, %) ^d 0,75 mg Kg^{-1}	9	14,42	11,63

^a Curva de calibração preparada e medida em triplicata. Coeficientes obtidos pela regressão linear feita no *Microsoft Excel*® 2016.

^b Limites calculados através da razão sinal/ruído.

^c Recuperação relativa (RR (%)) e desvio padrão relativo (RSD (%)) em triplicata como descrito no tópico 4.6.

^d Valores de desvio padrão relativo (RSD (%)) para os ensaios de precisão inter-dia e intra-dia como descrito no tópico 4.6.

Como pode ser observado na Tabela 6, a linearidade abrange uma ampla faixa de concentração sendo que o menor ponto da curva foi selecionado considerando o limite de quantificação obtido pelo sinal/ruído. De acordo com a regressão linear da curva de calibração na faixa de 0,10 - 1,50 mg Kg⁻¹ feita no *Microsoft Excel*® 2016, foram obtidos os coeficientes linear e angular e também o coeficiente de determinação (R^2), sendo este último item apresentando o valor de 0,971 para a NDMA e de 0,964 para a NDEA, o que indica a linearidade está um pouco abaixo do valor ideal de 0,99 segundo a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA na faixa de concentração empregada nos estudos, essa diferença entre o valor ideal e o alcançado pode ser explicada, visto que o procedimento realizado é manual, logo a destreza e a experiência do operador durante a extração deve ser levada em conta, podendo, dessa forma, ser aprimorada em estudos futuros.

O LOD para as NAs é o parâmetro comumente determinado nas validações feitas na literatura para diferentes métodos matrizes cárneas. No presente trabalho, o LOD alcançado foi de 4 e 38 µg Kg⁻¹ para NDEA e NDMA, respectivamente pela razão sinal/ruído. Valor esse maior que o máximo descrito na legislação canadense de 10 µg Kg⁻¹ para a NDMA. Com isso, pode-se inferir que o método ainda precisa de ajustes para ser aplicado na avaliação da presença da NDMA, já que não seria capaz de detectar essa NA na concentração mínima requerida pela legislação. Todavia, para a NDEA, embora não há uma legislação regulando a sua quantidade máxima em produtos cárneos, observa-se que o limite encontrado é inferior em comparação aos valores encontrados na literatura, entre 0,38 a 3,86 ng g⁻¹ (ANDRADE et al., 2005; OZEL et al., 2010; HUANG et al., 2013; RAZEMANI et al., 2015).

Outro parâmetro avaliado foi a exatidão do método, empregando a recuperação relativa. Observa-se que os valores estão na faixa de 92,3 a 111,5% nos três níveis de concentração analisados (0,10; 0,75 e 1,50 mg Kg⁻¹). Segundo a AOAC (2016), são aceitáveis intervalos de recuperação para análise de resíduos entre 60 e 115%, logo o método indicou ótima recuperação.

A precisão inter-dia e intra-dia foram avaliadas em termos de RSD e os valores obtidos variaram entre 2 a 11% para todos os ensaios de precisão nos níveis estudados. De acordo com o nível de concentração utilizado no método, são aceitos RSD de até 15% (AOAC, 2016). Com isso, o método apresenta uma precisão dentro do limite aceitável para o tipo de determinação realizada.

Com os dados obtidos de validação, o método desenvolvido HS/SPME-GC/FID possui atributos para quantificar com precisão e exatidão a NDMA e a NDEA em salsicha.

5.3. Aplicação do método HS-SPME-GC-FID em amostras reais

No presente trabalho foram analisadas amostras comerciais de salsichas, utilizando o método HS/SPME-GC/FID validado anteriormente. Foram analisadas 2 amostras adquiridas em diferentes comércios e em períodos distintos, com o intuito de avaliar a presença de contaminantes NAs em níveis alcançados pelo método desenvolvido.

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos das análises em triplicata de cada amostra comercial selecionada para o estudo.

Tabela 7. Dados experimentais das amostras reais de salsicha de diferentes fornecedores analisadas empregando o método HS/SPME-GC/FID frente a NDMA e NDEA.

Amostra	Conc. de NDMA ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Conc. de NDEA ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
Fornecedor 1	< 38*	< 4**
Fornecedor 2	< 38*	< 4**

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

*LOD da NDMA obtido pela razão sinal/ruído.

**LOD da NDEA obtido pela razão sinal/ruído.

A partir dos dados apresentados na Tabela 7, observa-se que não foram detectadas as NAs em nenhuma das amostras comerciais investigadas, sendo sua concentração indicada como menor do que o LOD da técnica.

6. Conclusão e Perspectivas

Este método desenvolvido e validado é um estudo preliminar, no qual foi possível obter a separação cromatográfica eficiente via GC/FID das duas NAs estudadas com sucesso, além de possibilitar a extração das NAs com eficiência ao estabelecer algumas condições ótimas para o preparo de amostra HS/SPME.

Após obter o método otimizado, este foi validado a fim de avaliar seu potencial na quantificação e possibilitar seu emprego em análises de amostras reais. Em relação aos parâmetros de mérito analítico do método para a NDMA e NDEA, foi observado que a técnica obteve bons resultados de seletividade, precisão e exatidão, a linearidade um pouco inferior ao ideal, e os LOD e LOQ com valores inferiores em comparação com outras metodologias utilizadas para a determinação em matrizes cárneas.

Este método apresentou resultados muito promissores, porém precisa ser aprimorado, visto que com as condições e resultados atuais, não é passível de ser aplicado para o estudo da contaminação de NDMA em salsichas devido ao limite de detecção e quantificação superior ao permitido na legislação canadense, todavia para a NDEA o método mostrou-se passível de ser aplicado para o estudo da possível contaminação nessa matriz.

Os resultados obtidos podem ser aprimorados com a adição de mais etapas de otimização no preparo de amostra, como a adição de maior quantidade de massa de salsicha no extrato avaliando-se o efeito de matriz, ou a utilização de um detector de nitrogênio e fósforo (NPD), o qual é equivalente ao FID em termos de custo de aquisição e manutenção, no intuito de obter resultados ainda mais eficientes em termos de sensibilidade.

7. Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**), 2017. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União nº 141. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401 Acessado em 06 de março de 2023.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**), 2019. RDC nº 272, de 14 de março de 2019. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Disponível em <http://antigo.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/servico-cidadao/145-noticias/noticias-2019/1023-anvisa-publica-rdc-272-2019-sobre-aditivos-alimentares-autorizados-para-uso-em-carne-e-produutos-carneos> Acessado em 28 de novembro de 2023.

AGLIO, Tharcilla de Castro et al. N-Nitrosaminas em medicamentos: um problema atual, uma realidade antiga. **Química Nova**, v. 45, p. 959-976, 2022.

ANDRADE, Raquel; REYES, Felix GR; RATH, Susanne. A method for the determination of volatile N-nitrosamines in food by HS-SPME-GC-TEA. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 173-179, 2005.

B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**, (2ª ed. 2014). ISBN 978 -91-87461-59-0. Disponível em <http://www.eurachem.org>. Acessado em 13 de maio de 2023.

BHARATE, S. S. Critical Analysis of Drug Product Recalls due to Nitrosamine Impurities. **Jornal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 6, p. 2923-2936, 25 mar. 2021.

CALDAS, Sergiane Souza et al. Modern techniques of sample preparation for pesticide residues determination in water by liquid chromatography with detection by diode array and mass spectrometry. **Química Nova**, v. 34, p. 1604-1617, 2011.

CAMPILLO, Natalia et al. Determination of volatile nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction and dispersive liquid–liquid microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 14, p. 1815-1821, 2011.

COLLINS, C. H. BRAGA, G. L. BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.

CREWS, Colin. The determination of N-nitrosamines in food. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 2, n. 1, p. 2-12, 2010.

DOMAŃSKA-BLICHARZ, KATARZYNA; RACHUBIK, JAROSŁAW; KOWALSKI, BOGDAN. Ocorrência de N-nitrosaminas voláteis em alimentos enlatados poloneses. **Bull Vet Inst Pulawy**, v. 49, p. 319-322, 2005.

DUTRA, Camila Braga; RATH, Susanne; GUILLERMO REYES REYES, F. Nitrosaminas voláteis em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, n. 1, p. 111-120, 2008.

FARRÉ, Maria José et al. N-Nitrosamines and their precursors in wastewater effluents from selected industries in Spain. **Journal of Hazardous Materials**, v. 451, p. 131159, 2023.

Haynes, W.M. (ed.). CRC Handbook of Chemistry and Physics. 95th Edition. CRC Press LLC, Boca Raton: FL 2014-2015, p. 3-418, 2014.

HUANG, Man-Chun et al. Determination of volatile N-nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction coupled with dispersive micro solid-phase extraction and gas chromatography–Chemical ionisation mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 227-233, 2013.

IARC; *Some N-nitroso compounds*, **IARC**: Lyon, France, 1978.

ICH Harmonised tripartite guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and methodology Q2 (R1). Current Step 4 version, 2006. Disponível em: <<https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>> Acessado em 07 de março de 2023.

JURADO-SÁNCHEZ, B.; BALLESTEROS, E.; GALLEGO, M. Comparison of the sensitivities of seven N-nitrosamines in pre-screened waters using an automated preconcentration system and gas chromatography with different detectors. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, n. 1-2, p. 66-73, 2007.

LIU, Y. et al. The progress of carcinogenic effects of nitrosamines on meat products and its controlling by lactic acid bacteria. **Food Ferment. Ind.**, v. 46, n. 16, p. 283-289, 2020.

LU, S. et al. Facile and sensitive determination of N-nitrosamines in food samples by high-performance liquid chromatography via combining fluorescent labeling with dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 234, p. 408-415, 2017.

OZEL, Mustafa Z. et al. Determination of volatile nitrosamines in various meat products using comprehensive gas chromatography–nitrogen chemiluminescence detection. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3268-3273, 2010.

PENSABENE, John W. et al. Rapid dry column method for determination of N-nitrosopyrrolidine in fried bacon. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 65, n. 1, p. 151-156, 1982.

PÉREZ-ORTUÑO, Raúl et al. Assessment of tobacco specific nitrosamines (TSNAs) in oral fluid as biomarkers of cancer risk: A population-based study. **Environmental Research**, v. 151, p. 635-641, 2016.

RAMEZANI, Houra et al. Rapid determination of nitrosamines in sausage and salami using microwave-assisted extraction and dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 240, p. 441-450, 2015.

SCHMIDT, Kamila; PODMORE, Ian. Current challenges in volatile organic compounds analysis as potential biomarkers of cancer. **Journal of biomarkers**, v. 2015, 2015.

Selectivity in analytical chemistry (IUPAC recommendations 2001), *Pure Appl. Chem.*, 2001, 73(8), 1381

SHIROIWA, L. **Desenvolvimento de metodologia analítica por HS-SPME-GC-MS para avaliação da presença de metabólitos resultantes da decomposição microbiana da água de lastro de biodiesel**. TCC - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 61. 2019.

SKOOG, Douglas A.; WEST, Donald M.; HOLLER, F. James. **Fundamentos de química analítica**. 8 Sao Paulo: Cengage Learning , 2009, 999 p.

SORIA, Ana Cristina et al. Gas Chromatographic Analysis of Food Bioactive Oligosaccharides. **Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity**, p. 370-398, 2014.

SPME Fibers. Disponível em: <https://www.restek.com/global/en/c/1355?Ns=restekProduct.x_productBadge%7C0>. Acessado em: 28 de novembro de 2023.

SUPELCO. **Catálogo de Cromatografia** - produtos para análise & purificação, 2005. 856 p.

TAVARES, A. **Desenvolvimento de metodologia para determinação de 3-alkil-2-metoxipirazinas em amostras de vinho empregando a técnica de microextração em fase sólida pelo modo headspace e cromatógrafo gasoso acoplado com detector de nitrogênio-fósforo**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 85. 2020.

THRESHER, A. et al. Are all nitrosamines concerning? A review of mutagenicity and carcinogenicity data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 116, 1 out. 2020.

TYHALI, Akhona; FORBES, Patricia BC. N- nitrosamines in surface and drinking waters: An African status report. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 116873, 2022.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. *Quimica Nova*, v. 23, n. 4, p. 523–530, 2000.

VAS, György; VEKEY, Karoly. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. **Journal of mass spectrometry**, v. 39, n. 3, p. 233-254, 2004.

WOGAN, GN; TANNENBAUM, SR Compostos N-nitrosos Ambientais: Implicações para a saúde pública. **Toxicologia e farmacologia aplicada** , v. 31, n. 3, pág. 375-383, 1975.

XIE, Yingfeng et al. N-nitrosamines in processed meats: Exposure, formation and mitigation strategies. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 13, p. 100645, 2023.

YAHAYA, Abdulrazaq et al. Application of chromatographic techniques in the analysis of total nitrosamines in water. **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. e03447, 2020.

ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Headspace Solid-Phase Microextraction. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 65, n. 14, p. 1843–1852, 1993.