



FURG

Dissertação de Mestrado

**EMPREGO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO ASSISTIDA
POR ULTRASSOM E HILIC-ESI-MS/MS NA AVALIAÇÃO
DE AMINAS BIOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE PESCADO**

SÓNIA MARIA VAZ SANCHES CARDOSO

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2018

**EMPREGO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO ASSISTIDA
POR ULTRASSOM E HILIC-ESI-MS/MS NA AVALIAÇÃO DAS
AMINAS BIOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE PESCADO**

por

SÓNIA MARIA VAZ SANCHES CARDOSO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade
Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para
obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

**Rio Grande, RS - Brasil
2018**

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**EMPREGO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO ASSISTIDA POR
ULTRASSOM E HILIC-ESI-MS/MS NA AVALIAÇÃO DAS AMINAS
BIOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE PESCADO**

elaborada por

Sônia Maria Vaz Sanches Cardoso

Comissão examinadora

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (Universidade Federal do Rio Grande - RS)

Prof. Dra. Eliana Badiale Furlong (Universidade Federal do Rio Grande - RS)

Prof. Dra. Liane Maldaner (Universidade Estadual de Maringá – PR)

Rio Grande, 26 de Fevereiro de 2018.

DEDICATÓRIA

À memória da minha mãe Joaquina Varela Vaz, e do meu pai João Sanches Cardoso, aquele que me ensinou valores, me deu muito amor, apoio e acreditou ser a educação o maior legado dos pais aos filhos, assim não poupando esforços para que eu tivesse uma boa formação acadêmica. Apenas posso agradecer por tudo que o senhor fez por mim, pois nunca conseguirei compensar devidamente a dedicação sempre manifestada. Meu eterno agradecimento a vocês. Amo muito vocês. Eternas saudades!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus** por sempre me guiar, pela paciência e coragem, me dando força e tranquilidade para seguir em frente. Brigada por ter colocado pessoas no meu caminho que permitiram a concretização de mais uma etapa na minha formação acadêmica.

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel** pela oportunidade, pela orientação nesse trabalho, pelo apoio e incentivo, e por permitir minha inserção no grupo. E por toda a confiança depositada em mim, tendo aceitado me orientar mesmo não me conhecendo. Brigada pelo suporte na minha chegada ao Brasil, pelo auxílio na obtenção do auxílio alimentação e auxílio moradia, além de outras assistências. Meus sinceros agradecimentos ainda por ter me apresentado ao professor Osmar, o que possibilitou a minha inserção no PPGQ da UFSM.

À **Prof. Dra. Eliana Badiale Furlong** pela disponibilidade em participar no exame de qualificação e na defesa da dissertação, muito obrigada pelas valiosas sugestões.

À **Prof. Dra. Liane Maldaner** pela disponibilidade em participar na defesa da dissertação, meus agradecimentos pelas valiosas contribuições.

À **Prof. Dra. Martha Bohrer Adaime** pela disponibilidade em participar no exame de qualificação, muito obrigada pelas valiosas sugestões.

Um agradecimento muito especial aos meus irmãos **José Maria Cardoso, João Baptista Cardoso, Fátima Cardoso** (minha segunda mãe). Brigada por terem me acompanhado ao longo destes dois anos, estando sempre presentes quando mais precisei, me dando o suporte necessário pra eu continuar focada no meu trabalho e firme nas minhas convicções. Brigada pela paciência e, acima de tudo, pelo companheirismo e grande amizade que me demostram. Amo muito vocês.

Aos meus amigos **Eliza, Heidi, Péricles, Dercio, Wilson, Nick, Tozê, e Caio**, aqueles que têm sido a definição do que um amigo é, aqueles que estão sempre ali, posicionados num cantinho estratégico entre a minha razão e a minha emoção e tendo sempre as melhores das intenções, seja em um elogio que me deixa contente ou em uma verdade que não consigo aceitar, aqueles que mesmo de longe sempre torcem por

mim, sempre me dando muita força pra eu seguir em frente. A vocês eu dedico a simplicidade dessas palavras. Aqueles, que nada mais são do que irmãos de outra família, pessoas com um valor inestimável em minha vida, a quem devoto a mais pura amizade. Sou muito grata por ter amigos como vocês. Saudades pessoal, já já estarei em casa de novo. Amo muito vocês.

Ana Victória, obrigada pela tua amizade, pelos momentos de descontração, pelos conselhos, pela agradável companhia, os quais tornaram todos os momentos mais alegres e agradáveis, mesmo estando longe. Que conquistas e vitórias sejam constantes na sua vida. Saudades tuas paraguaia.

Meus agradecimentos à **Família Marube. Lizi**, meus sinceros agradecimentos por todo o apoio e ajuda prestado ao longo destes dois anos. Te agradeço por ter me apresentado ao professor Ednei, o que possibilitou a minha inserção no PPGQTA. Brigada pelas valiosas sugestões ao longo de todo o trabalho, por sempre estar disponível quando precisei seja para trabalhos acadêmicos, seja para algo de caráter pessoal. Brigada por muitas vezes ter escutado minhas angústias e te agradeço pelos conselhos. Que sua vida seja repleta de muitas realizações e alegrias ao lado da tua família. Agradeço ainda ao **Newton** pela manutenção do computador, por me emprestar um computador para que eu possa dar continuidade aos trabalhos e pelas correções do inglês.

Alima, compartilhar da tua amizade é certamente umas das melhores coisas que a vinda ao Brasil me proporcionou. Te agradeço muito pelas agradáveis conversas, pelas risadas e pelas vivências transmitidas. Saudades.

Veronica, aquela que mesmo brigando o tempo todo comigo, mas sempre estava ali com uma palavra de afeto, um valioso conselho ou um abraço amigo. Meus sinceros agradecimentos por tua amizade e incrível companhia. Te amo muito, chata.

Agradeço ao **Igor** e ao **Juilson**, e à **Alaides, Mari e Dayana**, pelo acolhimento desde a minha primeira vinda ao Brasil, tendo permitido a formação de um laço muito especial que dura até hoje, e espero que continue sempre assim. Brigada pelos momentos de descontração, pelas inúmeras festas, pela parceria e agradável companhia de vocês e meu muito obrigada a vocês pelo acolhimento.

À **Família Africana**, Célia, Pedro, Esdras, Admilson, Zélia, Juncris, Virgílio, e à **Família OEA**, Verônica, Robert, Maria, Diana, Maurício, Carolina, Manuel, Christian, Carolina Dupon, Maria Angeles, Lurvin, Tatiana e Franco, brigada pelos momentos de descontração e pelos ensinamentos em termos da cultura africana e sul-americana, brigada pelas rodas de conversa, pelas festas, e brigada aos africanos pelo acolhimento, em especial à minha amiga **Célia**.

Aos **colegas do LACOM** que auxiliaram no desenvolvimento do trabalho. Agradeço à **Elisane** e à **Sergiane** pelos correções e valiosas contribuições nos trabalhos, sejam eles resumos para eventos científicos, artigo, projetos ou algum outro trabalho, e brigada Sergiane pelo auxílio na execução da parte prática do trabalho. Agradeço ainda à **Elisane** pela companhia e pelo acolhimento quando cheguei ao LACOM. Agradeço ainda à **Maris** pelas caronas. **Júlia**, a guria que ama lavar vial e integrar pico. Bah, nunca vi alguém amar lavar vial, mas enfim, te agradeço pela agradável companhia, pelos momentos de descontração e pelas risadas. Que continues sendo essa guria de uma alegria contagiante.

Agradeço ainda ao **João Felisberto** e à **Gionara Tauchen**, coordenadores do Programa de Pró-mobilidade Internacional – AULP, na FURG e UNICV, programa esse na qual tive a sorte de poder participar, o que abriu as portas para que eu pudesse dar continuidade à minha formação acadêmica.

Carol, talvez a pessoa mais encenqueira e valente que eu conheço, mas ao mesmo tempo consegue ser adorável, brigada por tua agradável companhia, e brigada por fazer meu cabelo.

À **FURG** por disponibilizar as infra-estruturas e os meios técnicos que permitiram a realização deste trabalho.

Aos **professores** do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, pelos ensinamentos durante a minha formação acadêmica.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** pelo auxílio financeiro, e aos demais órgãos de fomento pelos recursos fornecidos para o desenvolvimento do projeto.

À Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul - Programa de Apoio aos Polos Tecnológicos – Polo Pesqueiro (Convênio DCIT 70/2015 e 77/2016). Agradecimentos ainda ao **Banco Mundial**.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xviii
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxiv
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos Específicos.....	27
3. REVISÃO DA LITERATURA	28
3.1. Produção de pescado e sua importância na dieta humana	28
3.2. Deterioração do pescado e formação das BAs	29
3.3. Técnicas de preparo de amostra para a determinação de BAs	34
3.4. Fundamentos da USLE	36
3.5. Efeito matriz: estratégias para a sua minimização	37
3.5.1. Estratégias de minimização de efeito matriz no pescado	41
3.6. Separação e detecção das BAs	42
3.7. Cromatografia por interação hidrofílica	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1. Instrumentação	51
4.2. Reagentes, solventes e materiais	52
4.3. BAs selecionadas para o estudo.....	53

4.4.	Preparo das soluções analíticas	55
4.5.	Limpeza da vidraria	55
4.6.	Otimização do sistema LC-MS/MS para determinação de BAs em amostras de pescado	55
4.6.1.	Condições do espectrômetro de massas	55
4.6.2.	Preparo da fase móvel	56
4.6.3.	Condições de separação no LC	56
4.7.	Amostras de pescado	57
4.8.	Avaliação da USLE na extração de BAs em amostras de pescado	57
4.8.1.	Seleção do solvente extrator	58
4.8.2.	Solvente extrator acidificado	58
4.8.3.	Avaliação do efeito do sorvente na redução do efeito matriz	58
4.8.4.	Avaliação do pH	61
4.8.5.	Avaliação do efeito do sorvente em pH 12	61
4.8.6.	Efeito do solvente a pH 12 seguido da acidificação do extrato	61
4.9.	Quantificação das amostras	61
4.10.	Tratamento estatístico dos dados	61
5.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	62
5.1.	Otimização das condições de detecção no espectrômetro de massas	62
5.2.	Otimização do sistema cromatográfico para determinação das BAs	63
5.2.1.	Coluna C18 XTerra	63
5.2.2.	Coluna Luna HILIC	65
5.2.3.	Coluna Atlantis HILIC	69
5.3.	Extração sólido-líquido assistida por ultrassom	76
5.3.1.	Seleção do solvente extrator	76

5.3.2.	Solvente extrator acidificado.....	82
5.3.3.	Avaliação do efeito do sorvente na redução do efeito de matriz	85
5.3.4.	Avaliação do pH	90
5.3.5.	Avaliação do efeito do sorvente em pH 12	95
5.3.6.	Efeito do solvente a pH 12 seguido da acidificação do extrato.....	98
6.	CONCLUSÕES.....	102
7.	TRATAMENTO DOS RESÍDUOS.....	103
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	104
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
11.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DE MESTRADO	118
12.	ANEXO.....	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação da histamina mediante a descarboxilação bacteriana da histidina	30
Figura 2: Representação de algumas fases estacionárias empregadas em HILIC: (a) amida; (b) poli (succinimida); (c) sulfoalquilbetaína (zwitteriônica); (d) diol; (e) amina; e (f) ciano (Adaptado de NGUYEN, H. P. <i>et al.</i> , 2013).	45
Figura 3: Diagrama esquemático das interações ZIC-HILIC de Nglycan de 2- minopiridina sialilada. Interações eletrostáticas (atração e repulsão) e hidrofílicas entre o ácido siálico e o grupo de sulfobetaína na superfície da coluna ZIC. E ⁺ e E ⁻ são íons eletro-eletrolíticos positivos e negativos (ex. íons amônio e acetato) no eluente, respectivamente (Adaptado de RABEL, 2013).	46
Figura 4: Sequência de etapas da USLE	57
Figura 5: Esquema da USLE/d-SPE	59
Figura 6: Cromatograma no modo SRM para a mistura de 10 BAs na concentração de 1,0 mg L ⁻¹ nas condições ilustradas na Tabela 10	64
Figura 7: Cromatograma no modo SRM para a mistura de 10 BAs na concentração de 1,0 mg L ⁻¹ nas condições ilustradas na Tabela 11	66
Figura 8: Formato dos picos da HIS nas diferentes condições empregadas (1-5)	67
Figura 9: Distribuição das espécies da HIS vs pH (https://chemicalize.com/#/calculation)	69
Figura 10: Cromatograma no modo SRM para a mistura de 10 BAs na concentração de 1,0 mg L ⁻¹ nas condições ilustradas na Tabela 12	70
Figura 11: Fator de retenção (k) para os analitos em função da fase estacionária	72
Figura 12: k para os analitos em função da concentração do tampão	74
Figura 13: Perfil cromatográfico dos picos da PHE quando avaliado diferentes concentrações do tampão	76
Figura 14: Recuperações quando avaliado diferentes solventes. Barra de erro significa valores calculados em RSD. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3 g	77

Figura 15: Efeito matriz quando avaliado diferentes solventes. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3 g	79
Figura 16: Recuperações quando avaliado o solvente acidificado com HCl 0,1 mol L ⁻¹ e TCA 5%. Barra de erro significa valores calculados em RSD. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3 g	83
Figura 17: Efeito matriz quando avaliado solvente extractor acidificado com HCl 0,1 mol L ⁻¹ e TCA 5%. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3 g	84
Figura 18: Recuperações quando testado diferentes sorventes. Barra de erro significa valores calculados em RSD. O volume de solvente foi de 5 mL e a quantidade de sorvente foi de 150 mg.....	86
Figura 19: Efeito matriz quando avaliado diferentes sorventes. O volume do solvente foi de 5 mL e massa do sorvente de 150 mg	88
Figura 20: Recuperações quando avaliado o efeito do pH. Barra de erro significa valores calculados em RSD. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3 g	91
Figura 21: Distribuição das espécies de PHE vs pH (https://chemicalize.com/#/calculation).....	92
Figura 22: Distribuição das espécies de TRP vs pH (https://chemicalize.com/#/calculation).....	93
Figura 23: Efeito matriz quando avaliado o efeito do pH. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3 g	93
Figura 24: Recuperações quando testado o efeito dos sorventes em pH alcalino. Barra de erro significa valores calculados em RSD O volume de solvente foi de 5 mL e quantidade de sorvente de 150 mg	95
Figura 25: Efeito matriz quando testado o efeito dos sorventes em pH alcalino. O volume de solvente foi de 5 mL e a quantidade de sorvente de 150 mg	97
Figura 26: Recuperações quando testado solvente extrator alcalino seguido da acidificação do extrato. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3g	98
Figura 27: Efeito matriz quando avaliado o uso de solvente alcalinizado seguido da acidificação do extracto. O volume do solvente empregado foi de 5 mL e a massa de amostra de 3g	100

Figura 28: Cromatograma no modo SRM obtidos na condição de eluição 1 empregando a coluna C18 XTerra	121
Figura 29: Cromatograma no modo SRM obtido na condição de eluição 2 empregando a coluna C18 XTerra	122
Figura 30: Cromatograma no modo SRM obtido pela condição de eluição 3 empregando a coluna C18 XTerra	122
Figura 31: Cromatograma no modo SRM obtido pela condição de eluição 4 empregando a coluna C18 XTerra	123
Figura 32: Cromatograma no modo SRM obtido empregando a condição de eluição 1 na coluna Luna HILIC.....	125
Figura 33: Cromatograma no modo SRM obtido empregando a condição de eluição 2 na coluna Luna HILIC.....	126
Figura 34: Cromatograma no modo SRM obtido empregando a condição de eluição 3 na coluna Luna HILIC.....	126
Figura 35: Cromatograma no modo SRM obtido empregando a condição de eluição 4 na coluna Luna HILIC.....	127
Figura 36: Cromatograma no modo SRM obtido empregando a condição de eluição 5 na coluna Luna HILIC.....	127
Figura 37: Cromatograma no modo SRM obtido na condição de eluição 1 empregada na coluna Atlantis HILIC.....	130
Figura 38: Cromatograma no modo SRM obtido na condição de eluição 2 empregada na coluna Atlantis HILIC.....	130
Figura 39: Cromatograma no modo SRM obtido na condição de eluição 3 empregada na coluna Atlantis HILIC.....	131
Figura 40: Cromatograma no modo SRM obtido na condição de eluição 4 empregada na coluna Atlantis HILIC.....	131
Figura 41: Cromatograma no modo SRM obtido na condição de eluição 5 empregada na coluna Atlantis HILIC.....	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos fisiológicos e toxicológicos das BAs no organismo humano (BIJI <i>et al.</i> , 2016; MORATALLA <i>et al.</i> , 2014; PARCHAMI, 2017; POHANISH, 2012; SENTELLAS, 2016).....	32
Tabela 2: Níveis máximos permitidos para as BAs (CODEX ALIMENTARIUS, 2012; EU Regulation 2073/2005; MOHEDANO <i>et al.</i> , 2015)	33
Tabela 3: Emprego da LC na determinação de BAs em amostras de pescado.	48
Tabela 4: Valores de coeficiente de partição octanol-água (k_{ow}), pka, número CAS, massa molar, fórmula molecular e estrutural das BAs seleccionadas para o estudo (CHATZIMITAKOS <i>et al.</i> 2016; www.sigmaaldrich.com/brazil.html)	53
Tabela 5: Condições para a separação de uma mistura de solução padrão das 10 BAs na concentração de 1 mg L ⁻¹ (ACN: acetonitrila, FA: ácido fórmico, AF: formiato de amônio, d.i: diâmetro interno).....	56
Tabela 6: Propriedades físico-químicas dos solventes avaliados (ALAM <i>et al.</i> , 2017; MCKEEN, 2006).....	58
Tabela 7: Comparação dos sorventes empregados na limpeza do extrato (ARIAS <i>et al.</i> , 2014; https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/769290?lang=pt&region=BR ROMBALDI <i>et al.</i> , 2015).....	60
Tabela 8: Análise EDX da areia da praia do bojuru (% atômico)	60
Tabela 9: Condição de fragmentação das BAs no LC-MS/MS, com modo de ionização ESI+, transições monitoradas, voltagem do cone e energia de colisão.	62
Tabela 10: Condição de eluição empregada no modo gradiente usando a coluna C18 Xterra (FA: ácido fórmico)	64
Tabela 11: Condição de eluição usando a coluna Luna HILIC (FA: ácido fórmico; AF: formiato de amônio)	65
Tabela 12: Condição de eluição empregando a coluna Atlantis HILIC (FA: ácido fórmico; AF: formiato de amônio).....	70
Tabela 13: Resultados do teste Tukey HSD relativo às recuperações quando testado diferentes solventes	77

Tabela 14: Resultados do teste Tukey HSD relativo ao efeito matriz quando testado diferentes solventes	80
Tabela 15: Resultados do teste Tukey HSD relativo às recuperações quando testado etanol acidificado com TCA 5% e HCl 0,1 mol L ⁻¹	83
Tabela 16: Resultados do teste Tukey HSD relativo ao efeito matriz quando testado etanol acidificado com TCA 5% e HCl 0,1 mol L ⁻¹	85
Tabela 17: Resultados do teste Tukey HSD relativo às recuperações quando testado diferentes sorventes e sem o uso de sorvente	87
Tabela 18: Resultados do teste Tukey HSD relativo ao efeito matriz quando testado diferentes sorventes e sem o uso de sorvente	89
Tabela 19: Resultados do teste Tukey HSD relativo às recuperações quando testado solvente extrator a diferentes valores de pH	92
Tabela 20: Resultados do teste Tukey HSD relativo ao efeito matriz quando avaliado solvente extrator a diferentes valores de pH	94
Tabela 21: Resultados do teste Tukey HSD relativo às recuperações quando avaliado o efeito dos sorventes em pH alcalino	96
Tabela 22: Resultados do teste Tukey HSD relativo ao efeito matriz quando avaliado o efeito dos sorventes em pH alcalino	97
Tabela 23: Resultados do teste Tukey HSD em termos de recuperação quando avaliado solvente extrator alcalino seguido da acidificação do extrato	99
Tabela 24: Resultados do teste Tukey HSD para o efeito matriz quando avaliado o uso do solvente extrator seguido de acidificação do extrato	100
Tabela 25: Condição de eluição 1 empregada no modo gradiente para a coluna C18 XTerra	120
Tabela 26: Condição de eluição 2 empregada no modo gradiente para a coluna C18 XTerra	120
Tabela 27: Condição de eluição 3 empregada no modo gradiente para a coluna C18 XTerra	120
Tabela 28: Condição de eluição 4 empregada no modo gradiente para a coluna C18 XTerra	121

Tabela 29: Condição de eluição 1 empregada no modo gradiente para a coluna Luna HILIC	123
Tabela 30: Condição de eluição 2 empregada no modo gradiente para a coluna Luna HILIC	124
Tabela 31: Condição de eluição 3 empregada no modo gradiente para a coluna Luna HILIC	124
Tabela 32: Condição de eluição 4 empregada no modo gradiente para a coluna Luna HILIC	124
Tabela 33: Condição de eluição 5 empregada no modo gradiente para a coluna Luna HILIC	125
Tabela 34: Condição de eluição 1 empregada no modo gradiente para a coluna Atlantis HILIC	128
Tabela 35: Condição de eluição 2 empregada no modo gradiente para a coluna Atlantis HILIC	128
Tabela 36: Condição de eluição 3 empregada no modo gradiente para a coluna Atlantis HILIC	128
Tabela 37: Condição de eluição 4 empregada no modo gradiente para a coluna Atlantis HILIC	129
Tabela 38: Condição de eluição 5 empregada no modo gradiente para a coluna Atlantis HILIC	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF, formiato de amônio, do inglês *ammonium formate*

AGM, agmatina, do inglês *agmatine*

AOAC, associação oficial dos químicos analíticos, do inglês *association of official analytical chemists*

APCI, ionização química à pressão atmosférica, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*

BAs, aminas biogênicas, do inglês *biogenic amines*

C18, sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano

CAD, cadaverina, do inglês *cadaverine*

CE, eletroforese capilar, do inglês *capillary electrophoresis*

DLLME, microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*

DOP, dopamina, do inglês *dopamine*

d-SPE, extração em fase sólida dispersiva, do inglês *dispersive solid phase extraction*

EDX, espectroscopia de raios X por dispersão de energia, do inglês *energy dispersive x-ray spectrometry*

EFSA, Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, do inglês *European Food Safety Authority*

ESI, ionização por eletronebulização, do inglês *electrospray ionization*

ETM, etilamina, do inglês *ethylamine*

FA, ácido fórmico, do inglês *formic acid*

FAO, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA, Administração de Alimentos e Remédios, do inglês *Food and Drug Administration*

FLD, detector por fluorescência, do inglês *fluorescence detector*

GC, cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*

GC-MS, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography with mass spectrometry detector*

HILIC, cromatografia com interação hidrofílica, do inglês *hydrophilic liquid chromatography*

HILIC-MS/MS, cromatografia líquida com interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas em série, do inglês *hydrophilic interaction liquid chromatography hyphenated to tandem mass spectrometry*

HEP, heptilamina, do inglês *heptylamine*

HLB, equilíbrio lipofílico/hidrofílico, do inglês *hydrophilic lipophilic balance*

HIS, histamina, do inglês *histamine*

HPLC-DAD, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos, do inglês *high pressure liquid chromatography with diode array detector*

HPLC-FLD, cromatografia líquida de alta eficiência com detector por fluorescência, do inglês *ultra-high-pressure liquid chromatography with fluorescence detector*

HPLC-UV, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector ultravioleta, do inglês *high performance liquid chromatography with ultraviolet detector*

HSAB, ácidos e bases duros e moles, do inglês *hard soft acid base*

HSD, diferença honestamente significativa do inglês *honest significant difference*

IC, cromatografia iônica, do inglês *ionic chromatography*

ISM, isoamilamina, do inglês *isoamylamine*

K_{ow}, coeficiente de partição octanol-água, do inglês *octanol-water partition*

LC, cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatography*

LC-MS, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography coupled mass spectrometer*

LC-MS/MS, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série, do inglês *liquid chromatography tandem mass spectrometry*

LLE, extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction*

MEM, metilamina, do inglês *methylamine*

MOR, morfolina, do inglês *morpholine*

MS, espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*

MSPD, dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *matrix solid phase extraction*

m/z, razão massa por carga

NP-LC, cromatografia líquida de fase normal, do inglês *normal phase liquid chromatography*

pH, potencial hidrogeniônico

PHE, feniletilamina, do inglês *phenylethylamine*

pK_a, potencial de dissociação ácida

PRD, piridina, do inglês *pyridine*

PRL, pirrolidina, do inglês *pyrrolidine*

PRO, propilamina do inglês *propylamine*

PSA, amina primária secundária, do inglês *primary secondary amine*

PUT, putrescina, do inglês *putrescine*

RP-LC, cromatografia líquida de fase reversa, do inglês *reversed phase liquid chromatography*

RSD, desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*

SER, serotonina, do inglês *serotonina*

SLE, extração sólido líquido, do inglês *solid liquid extraction*

SPD, espermidina, do inglês *spermidine*

SPE, extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*

SPM, espermina, do inglês *spermine*

SPME, microextração em fase sólida, do inglês *solid-phase microextraction*

SRM, monitoramento de reações selecionadas, do inglês *selected reaction monitoring*

TIC, cromatograma de íon total, do inglês *total ion chromatogram*

t_R , tempo de retenção

TRP, triptamina, do inglês *triptamine*

UAE, extração assistida por ultrassom, do inglês, *ultrasound assisted extraction*

UA-LLE, extração líquido-líquido assistida por ultrassom, do inglês *ultrasound assisted liquid liquid extraction*

UHPLC-FLD, cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada ao detector por fluorescência, do inglês *ultra high performance liquid chromatograph with fluorescence detector*

UHPLC-MS/MS, cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série do inglês *ultra high performance liquid chromatograph tandem mass spectrometry*

UPLC-DAD, cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos, do inglês, *ultra performance liquid chromatography with diode array detector*

UPLC-MS, cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplado à espectrometria de massas, do inglês, *ultra performance liquid chromatography coupled mass spectrometer*

USLE, extração sólido líquido assistida por ultrassom, do inglês *ultrasound-assisted solid liquid extraction*

UV, ultravioleta

RESUMO

Título: EMPREGO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E HILIC-ESI-MS/MS NA AVALIAÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE PESCADO

Autor: Sônia Maria Vaz Sanches Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

A análise das aminas biogênicas (BAAs, do inglês *biogenic amines*) em amostras de pescado representa um grande desafio analítico devido a razões que incluem a complexidade da amostra e o caráter polar das BAAs, o que resulta numa maior solubilidade em água e não nos solventes frequentemente utilizados, o que pode comprometer a eficiência extrativa, resultando em baixas recuperações. A polaridade das BAAs limita ainda a sua separação pelas técnicas analíticas mais comumente utilizadas em cromatografia líquida. Deste modo, foi realizado neste estudo a avaliação do perfil de separação das BAAs, empregando cromatografia líquida de fase reversa e cromatografia por interação hidrofílica, avaliando as colunas C18 XTerra, Luna HILIC e a coluna Atlantis HILIC e o efeito da composição da fase móvel na eficiência de separação. A extração das BAAs foi realizada em amostras de pescada (*cynoscion guatucupa*), empregando-se a extração sólido-líquido assistida por ultrassom, avaliando a acidificação do solvente extrator e do extrato na remoção de interferentes, assim como o uso de materiais sorventes, além do uso de solvente extrator alcalinizado. Após a otimização foi possível obter picos cromatográficos bem resolvidos para as 10 aminas biogênicas em um tempo total de análise de 11 min, empregando a coluna Atlantis HILIC, modo de eluição por gradiente, empregando como fase móvel acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1% e água ultrapura acidificada com ácido fórmico 0,1% e com 50 mM de formiato de amônio. Os melhores resultados em termos de recuperação das BAAs foram obtidos empregando-se o solvente extrator a pH 12, com recuperações entre 64 e 121%. O estudo do efeito matriz indicou a necessidade de correção do mesmo.

Palavras-chaves: BAAs, HILIC-ESI-MS/MS, separação, USLE, efeito matriz

ABSTRACT

Title: EMPLOYMENT OF ULTRASOUND ASSISTED SOLID-LIQUID EXTRACTION AND HILIC-ESI-MS/MS IN THE EVALUATION OF BIOGENIC AMINES IN FISH SAMPLES

Author: Sónia Maria Vaz Sanches Cardoso

Advisor: Ednei Gilberto Primel, Ph.D.

The analysis of biogenic amines (BAs) in fish samples represents a major analytical challenge due to reasons that include sample complexity and the polar character of biogenic amines, which results in greater solubility in water and not in commonly used solvents, a fact that may compromise the extraction efficiency resulting in low recoveries. The polarity of the BAs further limits their separation by the most commonly used analytical techniques of separation in liquid chromatography. Therefore, the evaluation of the separation profile of these compounds was carried out in this study, employing reverse-phase liquid chromatography and chromatography by hydrophilic interactions, assessing C18 XTerra, Luna HILIC and Atlantis HILIC columns and the effect of the composition of the mobile phase on the separation efficiency. The extraction of BAs was carried out using ultrasound-assisted solid-liquid extraction, evaluating the acidification of the extracting solvent and extract in the removal of interferents, as well as the use of sorbent materials, besides the use of an alkaline extractive solvent. After optimization, it was possible to obtain well-resolved chromatographic peaks for 10 BAs in a total analysis time of 11 min, using an Atlantis HILIC column, gradient elution mode, acetonitrile acidified with 0.1% formic acid and ultrapure water acidified with 0.1% formic acid and 50 mM ammonium formate. The best results in terms of BA recovery were obtained using the extractor solvent at pH 12, with recoveries between 64 and 121%. The study of the matrix effect indicated the need for its correction.

Keywords: BAs, HILIC-ESI-MS/MS, separation, USLE, matrix effect.

1. INTRODUÇÃO

Nas ultimas décadas o progresso tecnológico de produção de alimentos aliado à consciência crítica crescente da população quanto aos perigos associados à alimentação fazem com que a segurança alimentar seja uma área em constante expansão, sendo um imprescindível em atividades que compreendam o fornecimento de gêneros alimentícios. Ciente desta realidade, das exigências por parte dos consumidores e da legislação, com o intuito de garantir a inocuidade dos alimentos e satisfazer os requisitos da legislação alimentar, os operadores do setor devem exercer o controle necessário para aferir o cumprimento desses requisitos e a comercialização de um produto com um constante padrão de qualidade (FAO, 2016a; GALVÃO, 2014).

Segundo os dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) referentes ao ano de 2014, o pescado constitui um importante componente da dieta em muitos países, contribuindo com 17% do consumo mundial de proteínas. Importa referir que, à medida que crescem as demandas e a produção do pescado, torna-se ainda mais importante a segurança desses produtos, uma vez que, problemas anteriormente considerados fenômenos localizados podem se espalhar para outras regiões como resultado do aumento do comércio internacional (FAO, 2016b).

Relatórios da FAO indicam o Brasil como uma potência importante na pesca e aquicultura. Entretanto, o comércio e o transporte intercontinentais de pescado e seus derivados aumentam o risco de transmissão global de doenças de origem alimentar ligada ao pescado, trazendo um impacto negativo para o mercado dos produtos de pesca, assim como para a sua exportação (ACEB, 2014; FAO, 2016a; FAO, 2016b).

No município de Rio Grande o setor da pesca é considerado importante no desenvolvimento socio-econômico da cidade, fundamentalmente pelas suas potencialidades na criação de empregos e na geração de divisas através da exportação do pescado. Entretanto, apesar da importância do setor pesqueiro para a cidade, o desenvolvimento do setor é afetado por constrangimentos de várias ordens, sobretudo

ligados à qualidade, produto da conservação, manuseio e tratamento em condições impróprias (KALKOSKI, 2013).

Os fatores acima mencionados, aliados à perecibilidade do pescado dificultam o cumprimento das medidas sanitárias necessárias que poderiam permitir a criação das bases para desenvolver um sistema de distribuição e comercialização, favorecendo um retorno econômico e incentivando o crescimento de toda cadeia produtiva. A preocupação em fomentar a produção pesqueira requer que se aumente o rigor no controle de doenças e na qualidade sanitária do pescado, sobretudo devido ao fato da ação microbiana originar inúmeros compostos, destacando-se as aminas biogênicas (BAs, do inglês *biogenic amines*), que estão associadas a patologias como, intoxicação escombróide, crises de hipertensão, crescimento de tumores e formação de nitrosaminas carcinogênicas, entre outros, o que enfatiza a necessidade de concentrar esforços no desenvolvimento de métodos que possibilitem a sua detecção (FAO/WHO, 2014; PARCHAMI *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2016; ZARE *et al.*, 2017).

Portanto, atendendo à importância do setor pesqueiro na cadeia produtiva de alimentos, torna-se necessário a implementação de estratégias que assegurem a qualidade dos produtos provenientes desta atividade (AFLAKI, 2015; FAO, 2016b; SINGH *et al.*, 2016). Neste sentido, foi realizado este estudo que propõe o desenvolvimento de um método de baixo custo e ambientalmente seguro empregando a extração sólido-líquido assistida por ultrassom (USLE, do inglês *ultrasound-assisted solid-liquid extraction*) e cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas em série (HILIC-MS/MS, do inglês *hydrophilic interaction liquid chromatography hyphenated to tandem mass spectrometry*) para a avaliação das BAs no pescado usando como modelo o material comercializado na cidade de Rio Grande, para contribuir com a qualidade sanitária do pescado, cuja resolução é, certamente, o ponto de partida para a transformação do setor das pescas e crescimento de toda a cadeia produtiva.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método empregando a USLE para a extração de BAs em amostras de pescado, com enfoque no uso de métodos que empreguem solventes de baixa toxicidade e recurso a estratégias de minimização de efeito matriz, seguido da avaliação por HILIC-ESI-MS/MS.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Selecionar os analitos para o estudo considerando a sua ocorrência no pescado e sua ligação a fenômenos de intoxicação;
- ✓ Estabelecer condições para separar e determinar as BAs presentes no pescado, a partir da avaliação da cromatografia líquida de fase reversa e a cromatografia por interação hidrofílica e da composição da fase móvel;
- ✓ Estabelecer um protocolo para preparo de amostra para a determinação das BAs no pescado empregando a USLE;
- ✓ Delinear estratégias para a minimização do efeito matriz, avaliando precipitação de proteínas e aminoácidos e a introdução de uma etapa adicional de limpeza do extrato por extração de fase sólida dispersiva, usando sorventes clássicos e alternativos;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Produção de pescado e sua importância na dieta humana

A produção mundial de pescado referentes ao ano 2014 foi de 167,2 milhões de toneladas, com um consumo per capita estimado em 20 kg. O pescado é um dos alimentos mais comercializados em todo o mundo, com relatórios de especialistas destacando o grande potencial dos oceanos e águas interiores, a contribuir significativamente para um fornecimento sustentável de alimentos e a segurança alimentar da população global. Além disso, o setor apoia a subsistência de centenas de milhões de pessoas, sendo especialmente importante para os países em desenvolvimento, onde por vezes, corresponde à metade das suas mercadorias comercializadas (BÉNÉ *et al*, 2016; FAO, 2016b; FIEDLER *et al*, 2016; OTTINGER *et al*, 2016).

Essa grande demanda pelo pescado tem a ver sobretudo com importantes mudanças nos padrões de consumo e a busca por um perfil nutricional adequado. O pescado se destaca por ser um alimento de fácil digestão, pela quantidade e qualidade de suas proteínas que contêm todos os aminoácidos essenciais, além da presença de vitaminas (principalmente do complexo B, vitaminas A e D), minerais (incluindo o cálcio, o iodo, zinco, ferro e selênio) e, principalmente pelos seus ácidos graxos essenciais (da família ômega-3), além de outros benefícios para a saúde, incluindo a prevenção do câncer e de acidentes vasculares cerebrais (GALVÃO, 2014; SHEIKHA *et al.*, 2017).

Embora o consumo do pescado seja comprovadamente benéfico à saúde, ele serve de veículo para uma variedade de doenças transmitidas por alimentos, incluindo intoxicações, o que motiva a necessidade de um esforço conjunto entre produtores, comerciantes, órgãos governamentais e consumidores, a fim de exigir e garantir melhor qualidade do produto disponível no mercado (FAO, 2016a; SHEIKHA *et al.*, 2017).

3.2. Deterioração do pescado e formação das BAs

A composição química do pescado lhe confere um alto valor nutricional, porém é altamente susceptível à deterioração endógena e exógena. O alto teor de umidade, o pH próximo da neutralidade, uma microbiota natural com grande potencial de deterioração e um elevado teor de nutrientes facilmente utilizáveis pelos microrganismos torna o pescado altamente perecível, podendo sofrer uma série de modificações físicas, químicas e microbiológicas, cujo estágio final é a sua deterioração (AFLAKI, 2015; FAO, 2016a; GALVÃO, 2014; SINGH *et al.*, 2016).

Se forem acrescidos a essas modificações, métodos de sanitização e higienização inadequados, capturas de pescado em águas poluídas, não observações nas condições ideais de refrigeração, manuseio e transporte, menor será o tempo de conservação do pescado. As atividades enzimáticas endógenas e microbianas causam alterações na concentração dos compostos presentes no pescado ou ainda podem originar novos. Geralmente as BAs estão ausentes ou encontram-se em concentrações mínimas em alimentos frescos. Contudo em alimentos em degradação podem estar presentes em concentrações significativas, sendo o pescado e seus derivados os alimentos mais envolvidos em fenômenos de intoxicação envolvendo as BAs (FU *et al.*, 2016; KAKATKAR *et al.*, 2017; MORATALLA, 2014).

As BAs são definidas como compostos nitrogenados produzidos principalmente pela descarboxilação bacteriana dos aminoácidos (Figura 1) e pela aminação redutiva de aldeídos e cetonas. As bactérias produtoras das BAs são mais susceptíveis de estar presentes nas brânquias, pele, ou no trato gastrointestinal no pescado. A migração destas bactérias ao músculo do peixe, onde os aminoácidos livres podem estar presentes, leva à formação das BAs. Em geral, o teor de BAs em pescados e derivados dependerá da espécie (isto é, a quantidade de aminoácidos livres), da maneira como é manuseado e da procedência do pescado (isto é, o potencial para o crescimento bacteriano) (BIJI *et al.*, 2016; FAO/WHO, 2014).

totalidade das aminas presentes, permitindo a sua rápida absorção, entrada no sistema circulatório e consequentes efeitos tóxicos. Esses compostos são responsáveis por importantes efeitos fisiológicos no organismo humano, entretanto, em função dessa variedade de funções desempenhadas, quando encontradas em altas concentrações, os seus efeitos são manifestados de diferentes formas (Tabela 1) (TOFALO *et al.*, 2016).

Tabela 1: Efeitos fisiológicos e toxicológicos das BAs no organismo humano (BIJI *et al.*, 2016; MORATALLA *et al.*, 2014; PARCHAMI, 2017; POHANISH, 2012; SENTELLAS, 2016)

BAs	Efeitos fisiológicos	Efeitos toxicológicos
Histamina	Estimula os neurônios sensoriais e motores; Controla a secreção gástrica; Estimula a musculatura lisa do útero, intestino e do trato respiratório	Dilatação dos vasos sanguíneos, hipotensão, rubor e dor de cabeça; Aumento permeabilidade capilar, edema, erupção cutânea, urticária, hemoconcentração e aumento da viscosidade do sangue; Contração do músculo liso intestinal levando a cólicas abdominais, diarreia e vômitos. Palpitações e aumento na taxa e a força das contrações e relaxamento da musculatura lisa extravasculares.
Triptamina	Neurotransmissor	Náuseas, vômitos, distúrbios neurológicos, dores de cabeça, distúrbios respiratórios, hipertensão arterial, dilatação das pupilas e do tecido palpebral, aumento da pressão sanguínea e potencializa a toxicidade da histamina
Putrescina, cadaverina, espermina e espermidina	Regulação do crescimento e diferenciação celular; Regulação da expressão gênica	Potenciais precursores para a formação de compostos N-nitrosos carcinogênicos; Potencializam o toxicidade da histamina; Hipertensão; Estão relacionadas com crescimento de tumores
Feniletilamina	Libera noradrenalina a partir do sistema nervoso	Aumento da pressão sanguínea; Dores de cabeça; Potencializa o toxicidade da histamina
Morfolina		Irritações cutâneas, oculares e respiratórias; Provoca danos no fígado e rins
Piridina		Irritações cutâneas, oculares e respiratórias; Pode afetar o sistema nervoso central; causa dor de cabeça, tonturas, vertigem, coma e morte; Provoca náuseas, vômitos e dor no estômago
Pirrolidina		Lesões oculares, dor de cabeça, convulsão, vômito, dor de garganta, etc.

Como estratégias para garantir a segurança do pescado e seus derivados, uma série de regulamentações foram desenvolvidas, podendo fornecer aos consumidores a confiança de que o pescado e seus derivados são seguros. Foram estabelecidos os níveis máximos permitidos para as BAs em amostras de pescado (Tabela 2), entretanto, ainda não foram bem estabelecidos para um grande número de BAs, isso devido ao fato delas ocorrerem naturalmente nos alimentos, e essa concentração ser dependente de cada tipo de alimento.

Tabela 2: Níveis máximos permitidos para as BAs (*CODEX ALIMENTARIUS*, 2012; EU Regulation 2073/2005; MOHEDANO *et al.*, 2015)

Limites máximos de BAs (mg kg ⁻¹)			
Agência	Histamina	Feniletilamina	Total de BAs
FDA	50 (peixe fresco) 100 (derivados do pescado)		1000
EFSA <i>Codex Alimentarius</i>	200 (¹ peixes da família <i>Scombridae</i> e <i>Scomberesocidae</i>) 400 (derivados do pescado)	30 (derivados aquáticos)	< 300
Mercosul	100 (peixes da família <i>Scombridae</i> , <i>combressocidae</i> , <i>Clupeidae</i> , <i>Coryphaenidae</i> e <i>Pomatomidae</i>)		

¹ Peixes da família *Scombridae* e *Scomberesocidae*, são os mais envolvidos em fenômenos de intoxicação envolvendo o pescado, além de serem mais propensos a ter maiores concentração de histamina devido a uma maior concentração do aminoácido precursor da histamina (histidina).

O estabelecimento de um sistema de rastreabilidade da qualidade do pescado é um aspecto importante a ser considerado em termos de segurança alimentar e aspectos econômicos. As BAs no pescado são de grande interesse não apenas pelo seu potencial risco para a saúde humana, mas também pelo fato de poderem ser utilizados como indicadores químicos da contaminação microbiana indesejada ou condições de processamento deficientes. Atendendo à relevância das implicações sensoriais e

toxicológicas das BAs, diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a extração e determinação destes compostos em amostras de pescado (ZARE *et al.*, 2017).

3.3. Técnicas de preparo de amostra para a determinação de BAs

Apesar dos avanços no desenvolvimento da instrumentação analítica altamente eficiente, a obtenção de bons resultados analíticos implica, muitas vezes, um processo que envolva a conversão da amostra em uma forma adequada para a análise química. O preparo de amostra é geralmente uma etapa morosa, mais propensa a erros, o que pode comprometer os resultados, tendo por isso um importante impacto na identificação e quantificação do analito. Pode incluir a dissolução da amostra, a extração/purificação do analito de uma matriz complexa, a pré-concentração de analitos em níveis muito baixos de modo a trazê-los para uma gama de concentração que esteja dentro dos limites de determinação, a conversão química (derivatização) do analito a uma forma que seja detectável e, finalmente, a separação dos analitos de outras espécies que possam interferir na análise (ARMENTA *et al.* 2015; BORGES *et al.*, 2015; CABRERA *et al.*, 2012).

Vários métodos foram desenvolvidos para a extração das BAs nos mais variados gêneros alimentícios. Os mais comumente utilizados incluem: extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*), microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid-phase microextraction*), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*), extração sólido-líquido (SLE, do inglês *solid-liquid extraction*) e a extração sólido-líquido assistida por ultrassom (USLE, do inglês *ultrasound-assisted solid-liquid extraction*) (BIJI *et al.*, 2016; MOHAMMED *et al.*, 2016; MORATALLA *et al.*, 2014).

A LLE envolve longos procedimentos de extração, muitas vezes usa grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos e passíveis de formar emulsões. Além das insuficiências apontadas acima, esta técnica muitas vezes é seguida de uma etapa de purificação, o que leva a um maior tempo de análise e maior consumo de reagentes

(resulta numa maior quantidade de resíduos), tornando o procedimento mais susceptível à contaminação e degradação dos analitos (BORGES *et al.*, 2015; CALDAS *et al.*, 2016).

A SPE apesar de amplamente aplicada, ela apresenta algumas limitações, como a necessidade de operação manual, está associada a um maior consumo de solventes em função da etapa adicional de obtenção do extrato, e, consequentemente um tempo ainda maior de análise. Vale ressaltar ainda que, a falta de seletividade dos adsorventes faz com que compostos de polaridade semelhante também sejam co-extraídos, aumentando o efeito matriz. O bom desempenho da SPE requer treinamento e atenção cuidadosa por parte do analista, além disso, dificuldades com o ajuste do vácuo afetam a reprodutibilidade na SPE (BORGES *et al.*, 2015).

Com relação a SPME, o elevado custo, a fragilidade do bastão de fibra e o seu tempo de vida limitados são alguns dos inconvenientes (MOHAMMED *et al.*, 2016).

A DLLME apesar de ser uma técnica de baixo custo, rápida e de baixo consumo de reagentes, a sua maior limitação reside na limitada gama de solventes que podem ser empregados, e sua aplicação, assim como a SPE e LLE, na extração das BAs no pescado conduz a um maior tempo de análise e um maior consumo de reagentes devido à necessidade de métodos que convertam a amostra sólida num extrato (CALDAS *et al.*, 2016; ORDÓÑEZ, 2016).

Existe uma ampla gama de métodos empregados na extração das BAs, no entanto, grande parte dos métodos utilizados são geralmente morosos, consomem um grande volume de solvente e quantidade amostra. Para superar essas limitações, as técnicas de preparo de amostra têm sido adaptadas para atingir simplicidade, miniaturização, reduzindo deste modo, solventes e outros produtos químicos perigosos para a saúde humana ou para o meio ambiente e que também possam permitir análises rápidas e mais eficientes, sem comprometer os critérios de validação (BIJI *et al.*, 2016; MOHAMMED *et al.*, 2016; ORDÓÑEZ, 2016; PLOTKA *et al.*, 2017; VIAN *et al.*, 2017).

Entre os diferentes métodos de extração, a USLE se destaca por ser uma técnica de extração ambientalmente segura, com alto rendimento de extração, baixo consumo de energia e curto tempo de extração, sugerindo então que a USLE seja uma alternativa para extração de BAs em amostras de pescado (PRADAL *et al.*, 2016; TIWARI, 2015; ZHANG *et al.*, 2016; ZUBIAGUIRRE *et al.*, 2015).

3.4. Fundamentos da USLE

A extração assistida por ultrassom tem sido amplamente utilizada como técnica de preparo de amostra, devido ao seu baixo custo, rapidez, baixo consumo de solvente, além da pequena quantidade de amostra. É uma técnica de extração considerada relativamente simples, consistindo apenas na mistura da amostra com solvente, seguida de uma agitação manual ou mecânica, com posterior submissão da amostra a ondas ultrassônicas (ALDHABI *et al.*, 2017; TIWARI, 2015; ZUBIAGUIRRE *et al.*, 2015).

Os efeitos sonoquímicos do ultrassom no líquido são atribuídos ao fenômeno da cavitação, à formação de bolhas, seu crescimento e colapso. A cavitação ocorre quando sob o efeito de ondas ultrassônicas, a pressão for maior que as forças de coesão entre as moléculas que compõem o líquido, formando-se então espaços vazios no líquido que são denominadas bolhas de cavitação. Quando a pressão aumenta pelo efeito de aproximação das moléculas no líquido, ocorre o rompimento das bolhas (PICÓ, 2013; TIWARI, 2015; XU *et al.*, 2017).

Esse colapso das bolhas provoca diversos mecanismos que melhoram o processo de extração. São eles a fragmentação, a erosão e a destexturização. A colisão entre as partículas e ondas de choque provocada pelas bolhas, provoca a fragmentação dessas partículas, originando partículas de menor granulometria, o que aumenta a superfície de contato, melhora a solubilização do analito no solvente, e consequentemente aumenta a transferência de massa e eficiência de extração. Além disso, a implosão das bolhas de cavitação na superfície da matriz, origina deformações localizadas, degradação da parede celular e afeta também a permeabilidade dos componentes da matriz, favorecendo o acesso do solvente e difusão do analito (DRANCA *et al.*, 2016; HE *et al.*, 2016b; PICÓ, 2013; XU *et al.*, 2017).

A técnica de extração utilizada além de proporcionar uma alta eficiência extrativa, é importante que tenha também uma contribuição no carácter ecológico do processo analítico. A USLE é considerada como sendo um processo de extração verde, por ser rápido e por isso consome pouca energia, requer uma quantidade menor de solventes comparativamente aos métodos tradicionais, e consequentemente gera uma quantidade menor de resíduos (PRADAL *et al.*, 2016; TIWARI, 2015; ZHANG *et al.*, 2016).

Estas inúmeras vantagens do emprego do ultrassom proporcionadas pelos diferentes mecanismos mencionados anteriormente contribuem para aumentar a transferência de massa e melhorar a extração. Entretanto, apesar das ondas ultrassônicas aumentarem a taxa de difusão dos analitos para a fase orgânica, também aumentam a extração dos co-extrativos, de modo que, muitas vezes se faz necessário o recurso a medidas que possibilitem a redução do efeito matriz (HE *et al.*, 2016b; XU *et al.*, 2017).

3.5. Efeito matriz: estratégias para a sua minimização

O efeito matriz é definido como o efeito dos componentes da matriz na resposta analítica. Estes componentes por terem propriedades químicas similares às dos analitos, podem reagir com os mesmos reagentes, podem eluir em tempos de retenção próximos àqueles dos analitos, provocando uma resposta instrumental que pode não ser facilmente distinguida daquela do analito (KACZYNSKI, 2017; Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166; TAYLOR, 2005; YANG, 2015).

Quando se efetua a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS, do inglês *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*), a presença de interferentes leva a alterações no processo de obtenção dos respectivos íons a serem analisados no espectrômetro de massas. A presença de co-extrativos influencia os sinais do analito, podendo ocorrer problemas de supressão ou enriquecimento do sinal dos analitos quando comparados à resposta em solvente puro, o que pode afetar negativamente a precisão, a reprodutibilidade e a sensibilidade do método, além de afetar a quantificação desses compostos (GOMEZ *et al.*, 2016; KEBARLE *et al.*, 2010; KACZYNSKI, 2017; TAYLOR, 2005; YANG *et al.*, 2015; ZANELLA *et al.*, 2017).

O efeito matriz mais comum quando se emprega a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) com ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*) é a supressão de íons. O processo de ionização por ESI que leva à formação de íons em fase gasosa pode ser subdividido em vários estágios: (a) a produção das gotículas carregadas na ponta capilar; (b) encolhimento das gotículas carregadas por evaporação do solvente e à fissão de gotículas e a (c) formação dos íons.

Qualquer fenômeno que possa diminuir a taxa de produção das gotículas e, finalmente, a formação dos íons em fase gasosa, pode participar na supressão do sinal (KEBARLE *et al.*, 2010; KACZYNSKI, 2017; TRUFELLI *et al.*, 2011).

Diferentes mecanismos foram propostos para elucidar o que leva a uma diminuição da eficiência de ionização. Uma das teorias propostas está relacionada com a co-eluição de compostos interferentes, especialmente compostos básicos, que podem desprotonar e neutralizar os íons dos analitos e, assim, reduzir a formação de íons do analito protonado. Outra teoria postula que compostos menos voláteis podem afetar a eficiência da formação de gotículas e reduzir a capacidade de conversão das gotículas carregadas em íons de fase gasosa. Esses materiais não voláteis (ex. fosfato utilizado na fase móvel ou ainda lípidios provenientes da amostra) podem ainda se acumular na interface do LC-MS ou na face frontal dos quadrupolos do espectrômetro de massas. Essa acumulação de materiais não voláteis pode aumentar a resistência elétrica, evitando assim que os íons sigam o gradiente eletromagnético no detector, resultando em perda de sinal, além de aumentar a frequência de manutenções do equipamento. Também foi postulado que o efeito matriz pode ser causado por compostos interferentes de alta viscosidade que poderiam aumentar a tensão superficial do efluente da coluna e consequentemente, a formação da gota e a evaporação, afetando assim o número de íons carregados (CAPPIELLO *et al.*, 2010; CHIU *et al.*, 2010; CHIN *et al.*, 2004; GOMEZ *et al.*, 2016; HALL *et al.*, 2012; HEWAVITHARANA *et al.*, 2014; ZANELLA *et al.*, 2017).

De acordo com TRUFELLI *et al.*, 2011 um outro mecanismo possível ocorre quando componentes da matriz ou aditivos de fase móvel atuam como reagentes de emparelhamento de íons com os íons de analito pré-formados (TRUFELLI *et al.*, 2011).

Apesar das inúmeras hipóteses existentes para elucidar os processos de supressão do sinal, poucas informações existem a cerca dos mecanismos responsáveis pelo enriquecimento do sinal. De acordo com CECH *et al.*, 2000 e TRUFELLI, *et al.*, 2011 este processo de aprimoramento do sinal depende da afinidade do analito para a superfície das gotículas, e, dependendo da fragmentação, os íons com valores de razão m/z específicos podem se sobrepor, resultando no enriquecimento do sinal (CECH *et al.*, 2000; TRUFELLI, *et al.*, 2011).

Diferentes procedimentos podem ser implementados durante o desenvolvimento do método para reduzir o número de co-extrativos. Procedimentos de limpeza do extrato ou otimização da separação cromatográfica podem reduzir a introdução de componentes da matriz no sistema analítico (GOMEZ *et al.*, 2016; GONZALEZ *et al.*, 2017; TAYLOR, 2005; YANG *et al.*, 2015; ZANELLA *et al.*, 2015).

A otimização da separação cromatográfica é uma medida que pode resultar no decréscimo do efeito matriz, uma vez que conseguindo uma boa separação, diminui-se a competição pela ionização e consequentemente consegue-se reduzir o efeito matriz. Essa otimização pode ser feita a partir da avaliação da composição da fase móvel, da força de eluição e da duração do gradiente. É importante operar em condições de fase móvel que modifiquem o tempo de retenção dos analitos, de modo a evitar a sua eluição em áreas mais afetadas pela supressão ou enriquecimento do sinal. Geralmente as áreas cromatográficas mais afetadas por interferências são o início da análise cromatográfica onde são eluídos os compostos não retidos e o final do gradiente de eluição, onde os compostos fortemente retidos são eluídos (GOMEZ *et al.*, 2016; GONZALEZ *et al.*, 2017; TRUFELLI *et al.*, 2011).

O pH da fase móvel e a concentração de aditivos também podem ser críticos na redução do efeito matriz, uma vez que podem ser determinantes na otimização da separação cromatográfica, além de controlar a força iônica do meio, podendo inibir interações eletrostáticas que poderiam resultar no incremento do efeito matriz. Por outro lado, a adição de tampões na fase móvel pode resultar em efeitos de supressão devido ao aumento do número de íons no spray (CHIU *et al.*, 2010).

Modificações das condições do espectrômetro de massas pode ser uma solução vantajosa na minimização do efeito matriz. Alterações na fonte de ionização pode ser uma boa estratégia de redução da interferência de co-extrativos. Estudos evidenciam que a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) é menos propenso ao efeito matriz. Portanto, uma mudança de ESI para APCI pode ser uma alternativa viável na redução do efeito matriz (CAPPIELLO *et al.*, 2010; CHIN *et al.*, 2004; GONZALEZ *et al.*, 2017; TAYLOR, 2005; TRUFELLI *et al.*, 2011).

Uma abordagem alternativa de minimização do efeito matriz geralmente aplicada seria a diluição da amostra ou uma redução do volume injetado. No entanto, esta estratégia pode ser crítica para o analito presente em baixas concentrações (GONZALEZ *et al.*, 2017; TRUFELLI *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2015).

Outra estratégia amplamente utilizada para a redução do efeito matriz está relacionada com a otimização da técnica de preparo de amostra (GOMEZ *et al.*, 2016; ZANELLA *et al.*, 2017).

A minimização dos interferentes como proteínas e gorduras pode ser conseguida mediante o emprego de uma etapa de congelamento ou uso de gelo seco. Por outro lado, procedimentos como precipitação de proteínas mediante a acidificação do meio até o ponto isoelétrico das proteínas (pH=4,5) são outras medidas passíveis de promover um decréscimo da interferência de proteínas na análise. A alcalinização do meio com o intuito inibir a interferência dos aminoácidos através da sua precipitação também pode ser utilizado na redução do efeito matriz (RICHARD *et al.*, 2011; TRUFELLI *et al.*, 2011).

Uma etapa adicional de limpeza por SPE ou extração de fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*) também tem sido bastante empregado na tentativa de minimizar o efeito matriz. Neste procedimento aplica-se materiais sorventes como carbono grafitizado, PSA, C18 ou ainda sorventes alternativos como quitina, quitosana, areia e concha de mexilhão que tem recebido bastante atenção na remoção de co-extrativos, atenção justificada por suas vantagens em termos de aspectos econômicos e ambientais, sendo uma importante estratégia com vista ao desenvolvimento de produtos de valor agregado, cujas oportunidades e áreas de inserção são bastantes amplas, destacando-se o seu uso enquanto biomaterial alternativo na remoção de interferentes (DOTTO *et al.*, 2017; PENG *et al.*, 2016; ROMBALDI *et al.*, 2015; ZANELLA *et al.*, 2015).

A estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte. O C18 e a alumina possuem a capacidade de reter co-extrativos lipofílicos e interferentes apolares. A quitina, a quitosana, a areia e a concha de mexilhão também já foram reportados na literatura como sorventes para a etapa de limpeza do extrato, atuando na remoção de

diversas classes de moléculas, dentre elas os lípideos e moléculas aromáticas (ARIAS *et al.*, 2014; CABRERA *et al.*, 2012; CERQUEIRA *et al.*, 2014; PENG *et al.*, 2016; ROMBALDI *et al.*, 2015).

3.5.1. Estratégias de minimização de efeito matriz no pescado

Atendendo ao fato do pescado representar uma matriz complexa, uma etapa adicional de remoção de interferentes é certamente uma etapa-chave no desenvolvimento do método, representando, adicionalmente, um enorme desafio, isso devido à complexidade dessa matriz. Na determinação das BAs em amostras de pescado os interferentes mais comumente encontrados são os aminoácidos, peptídeos, proteínas e lipídios (RICHARD *et al.*, 2011).

Diferentes procedimentos são reportados na literatura no intuito de reduzir os co-extrativos antes da análise, incluindo derivatização, uso de uma coluna de troca iônica, acidificação ou alcalinização do meio ou ainda uma etapa adicional de limpeza do extrato (AOAC, 977.13, 2002; FU *et al.*, 2016; KILCOYNEA *et al.*, 2010; RICHARD *et al.*, 2011; SAGRATINI *et al.*, 2012).

Com o intuito de reduzir a interferência de proteínas e lipídios na análise de BAs em amostras de pescado, MOLOGNONI *et al.*, 2017 empregou como solvente extrator metanol: acetonitrila: água, na proporção 45:45:10 (v/v/v), acidificada com 0,1% de ácido acético, seguido do congelamento do extrato a -60 ° C por uma hora. A utilização da acetonitrila como solvente extrator, associado à acidificação do meio foi efetivo na remoção de proteínas. Por outro lado, a etapa de congelamento eliminou grandes quantidades de interferentes lipídicos (MOLOGNONI *et al.*, 2017).

RICHARD *et al.*, 2008 e RICHARD *et al.*, 2011 avaliaram o uso do HCl 0,1 mol L⁻¹ e metanol acidificado com HCl (75% de metanol em HCl 0,1 mol L⁻¹) na recuperação das BAs e remoção das proteínas. Realizaram ainda uma etapa de adicional de congelamento do extrato para a remoção dos lipídios. Ambos os procedimentos foram eficientes na remoção de proteínas e interferentes lipídicos (RICHARD *et al.*, 2008; RICHARD *et al.*, 2011).

A espectrometria de massas tem substituído os métodos mais comumente empregados na detecção das BAs principalmente devido à não requisição da etapa de

derivatização. Entretanto, com a finalidade de reduzir o efeito de matriz, alguns autores têm empregado uma etapa adicional de derivatização mesmo empregando o espectrômetro de massas como detector. FU et al., 2016 determinou 11 BAs por LC-MS, utilizando o cloreto de benzoíla com reagente derivatizante. O recurso a processos de derivatização origina compostos com maior massa molecular, que por sua vez originam fragmentos de maior razão m/z , sendo estes, menos afetados pelo efeito de enriquecimento do sinal. Em contrapartida, de acordo com CAPPIELLO et al., 2010 e CECH et al., 2000, compostos mais polares são mais afetados pela supressão de íons. As reações de derivatização diminuem a polaridades das BAs, resultando deste modo, num decréscimo do efeito matriz (CAPPIELLO et al., 2010; CECH et al., 2000; FU et al., 2016).

Uma outra estratégia bastante utilizada na redução de co-extrativos em amostras de pescado é a limpeza do extrato por SPE. Cartuchos de equilíbrio lipofílico/hidrofílico (HLB, do inglês *hydrophilic lipophilic balance*) e Strata C18 foram empregados por KILCOYNE et al., 2010 e SAGRATINI et al., 2012 na remoção de interferentes hidrofílicos e hidrofóbicos. KILCOYNE et al., 2010 realizou ainda estudos a cerca do efeito da composição da fase móvel na otimização da separação cromatográfica, e consequentemente, na redução do efeito matriz (KILCOYNE et al., 2010; SAGRATINI et al., 2012).

3.6. Separação e detecção das BAs

A determinação das BAs é mais comumente realizada por meio de técnicas de separação: cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*), cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) e eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) (HE et al., 2016a; PARCHAMI, 2017; PAPAGEORGIOU et al., 2018).

A técnica mais amplamente empregada na determinação de BAs em produtos alimentares é a cromatografia líquida em fase reversa (RP-LC, do inglês *reversed phase liquid chromatography*), usando colunas C18, com detecção por fluorescência (FLD, detector por fluorescência, do inglês *fluorescence detector*) ou ultravioleta (UV). No entanto, em função da baixa absorção das BAs nos intervalos de comprimento de onda no UV ou ausência de grupos cromóforos, a sua detecção por LC acoplada ao detector

UV e FLD necessita de processos de derivatização. Por outro lado, a alta polaridade das BAs dificulta a sua análise pela RP-LC, em função da baixa retenção nas fases estacionárias empregadas, necessitando deste modo, de abordagens que permitam um aumento da hidrofobicidade das BAs, por meio de reações de derivatização, e assim tornar possível a sua interação com a fase estacionária das colunas empregadas na RP-LC (BIJI *et al.*, 2016; MORATALLA *et al.*, 2014; MOHAMMED, 2016; PLOTKA, 2016; PAPAGEORGIOU *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que, os reagentes derivatizantes podem reagir com compostos indesejáveis presentes na matriz, exigindo então que se tenha uma etapa de limpeza ou re-extração da amostra derivatizada, o que ocasiona um maior consumo de reagentes. Além disso, as reações de derivatização são demoradas e aumentam o risco de se ter baixa recuperação, perda de analito, contaminação, sendo portanto prejudicial para a sensibilidade e a reprodutibilidade dos resultados em relação aos obtidos pelos métodos que não efetuam a derivatização (SAGRATINI *et al.*, 2012; ERIM, 2013). Neste sentido, a espectrometria de massas tem substituído os métodos convencionais de detecção na determinação BAs devido à alta sensibilidade e informação estrutural relevante dos espectros de massa, além da não requisição da etapa de derivatização (JASTRZEBSKA *et al.*, 2018).

SAGRATINI *et al.*, 2012, comparou a determinação das BAs não derivatizadas em tecidos de peixe por LC com detecção por MS e por FLD usando cloreto de dansilo como derivatizante e concluiu que a determinação por LC-MS/MS afigura-se como uma boa alternativa para análise de BAs, sendo um dos métodos mais sensíveis e específicos disponíveis para a sua quantificação, além de eximir a etapa da derivatização, o que se traduz num menor consumo de reagentes, menor tempo de análise e a amostra estaria menos propensa à contaminações (SAGRATINI *et al.*, 2012).

Um outra alternativa para a análise das BAs, sem a etapa da derivatização é a utilização de colunas de interações hidrofílicas, que devido à natureza polar da sua fase estacionária, poderão permitir uma maior retenção e eficiência de separação das BAs (BUSZEWSKI *et al.*, 2012; GOSETTI *et al.*, 2013; JANDERA, 2011; KOUPPARIS *et al.*, 2013; LÓPEZ *et al.*, 2017; MOLDOVEANU *et al.*, 2017b).

3.7. Cromatografia por interação hidrofílica

Os métodos cromatográficos mais comumente empregados são RP-LC e a cromatografia líquida de fase normal (NP-LC, do inglês *normal phase liquid chromatography*). Entretanto, uma das limitações dessas técnicas de separação prende-se com a limitada aplicabilidade para a análise de compostos hidrofílicos, produto da reduzida solubilidade das moléculas hidrofílicas em fase móvel apolar empregada em NP-LC e a fraca retenção dos analitos polares na fase estacionária apolar empregada em RP-LC. Com o intuito de minimizar problemas relacionados à análise de compostos polares, ALPERT em 1990 introduziu a cromatografia por interação hidrofílica (HILIC, do inglês *hydrophilic liquid chromatography*) (ALPERT, 1990; SILVA *et al.*, 2016).

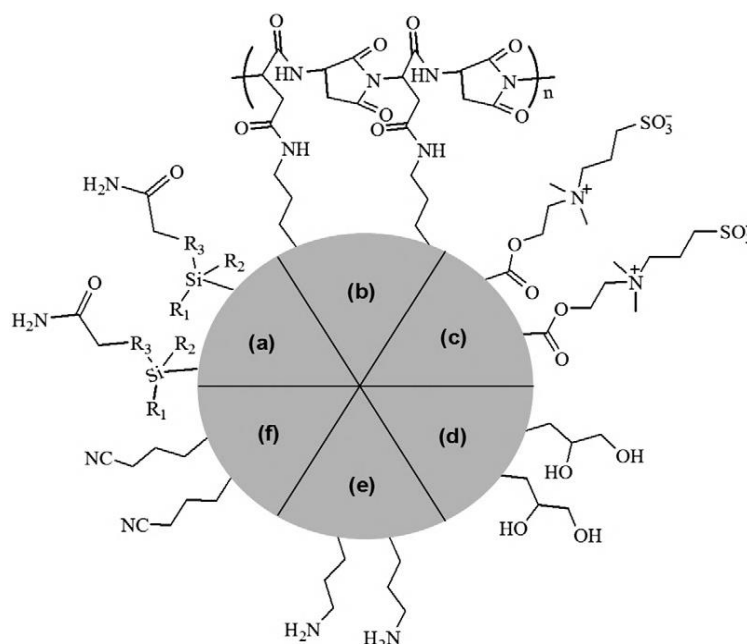
Alguns autores descrevem a HILIC como o eixo de conexão entre a RP-LC, NP-LC e a cromatografia iônica (IC, do inglês *ionic chromatography*), uma vez que, assim como na NP-LC, a mesma também emprega fase estacionária hidrofílica baseada em sílica pura ou sílica derivatizada, mas por outro lado, apresenta condições típicas da RP-LC, o que está relacionado com fase móvel utilizada, que consiste de uma solução contendo pelo menos 2,5% de água e mais de 60% de solvente orgânico (tipicamente acetonitrila). A HILIC possui ainda particularidades da IC, isso devido à sua capacidade de analisar compostos ionizáveis (BUSZEWSKI *et al.*, 2012; JANDERA, 2011; KOUPPARIS *et al.*, 2013; KACZYNSKI, 2017; SILVA *et al.*, 2016).

A fase móvel empregada em HILIC geralmente contém uma solução tampão (na concentração de 5 a 100 mM) e aditivos ácidos, cujo pH e força iônica afetam significativamente a retenção e separação nos analitos. Esses aditivos são necessários principalmente quando se analisa compostos ionizáveis, de forma a assegurar que o analito esteja numa única forma iônica, evitando deste modo a possibilidade de ter irregularidades no perfil cromatográfico dos picos. Um aspecto particular das colunas HILIC está relacionado com a dependência da fase estacionária com relação à fase móvel. O pH da fase móvel controla o estado de ionização dos grupos polares da fase estacionária, de modo que, a ação de uma fase estacionária como permutador de ânions ou cátions ou apenas como uma fase polar depende do pH da fase móvel. Mesmo a ionização de grupos silanóis na sílica pura depende do pH da fase móvel. Além disso, a quantidade de água adsorvida na superfície da fase polar influencia o fator de retenção

da coluna (GUO *et al.*, 2013; MCCALLEY, 2013; MCCALLEY, 2017a; MCCALLEY, 2017b; MOLDOVEANU *et al.*, 2017a).

As fases estacionárias empregadas em HILIC são polares, sendo classificadas em: (1) sílica pura, (2) sílica modificada com grupamentos neutros, (3) sílica com grupos de troca iônica, (4) sílica modificada com grupos zwitteriônicos e (5) sílica derivatizada com grupos polares e hidrofóbicos, conforme a Figura 2 (IBRAHIM *et al.*, 2013; JANDERA, 2011; MOLDOVEANU, *et al.*, 2017b; MCCALLEY, 2017b; SILVA *et al.*, 2016).

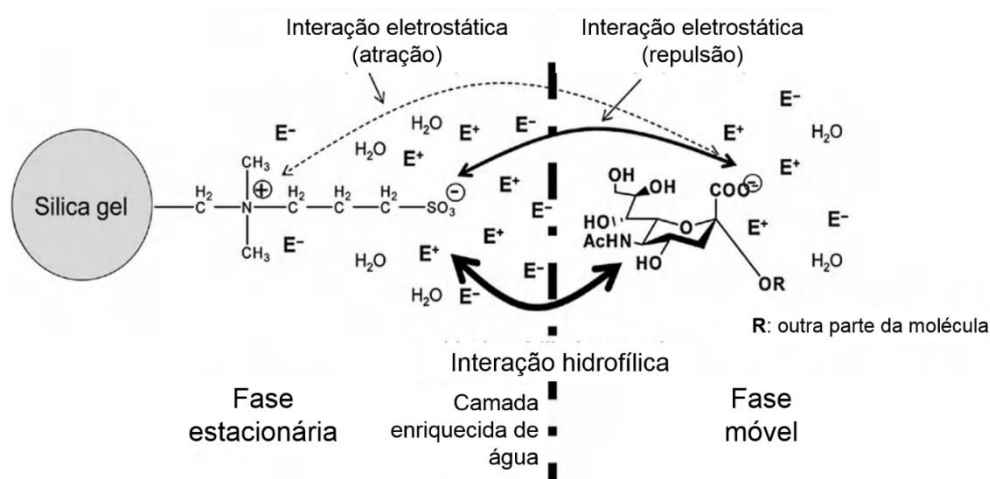
Figura 2: Representação de algumas fases estacionárias empregadas em HILIC: (a) amida; (b) poli (succinimida); (c) sulfoalquilbetaína (zwitteriônica); (d) diol; (e) amina; e (f) ciano (Adaptado de NGUYEN, H. P. *et al.*, 2013).



O mecanismo de separação em HILIC é baseado no equilíbrio de partição hidrofílica dos analitos entre a camada de água imobilizada na superfície da fase estacionária e a fase móvel deficiente em água. As interações dipolo-dipolo e as ligações de hidrogênio também podem contribuir na partição dos analitos. Por outro lado, as interações eletrostáticas podem desempenhar um papel importante na HILIC, devido aos grupos iônicos que podem ser intencionalmente incorporados na fase estacionária ou cargas residuais como as dos grupos silanóis (ALPERT, 1990; GRITTI *et al.*, 2015; HEATON *et al.*, 2014; IVERSON *et al.*, 2016; IBRAHIM *et al.*, 2013; MCCALLEY, 2015). Portanto, o mecanismo de separação com colunas HILIC é baseado na sinergia entre

interações hidrofílicas, interações por ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas (Figura 3). O grau de dominação de cada mecanismo irá depender da fase estacionária utilizada, e das condições da fase móvel, incluindo o tipo e a quantidade de solvente orgânico empregado, além da concentração dos aditivos e do pH. A compreensão dos mecanismos de retenção e o impacto das propriedades da fase estacionária e da fase móvel nas separações permitem a obtenção de uma boa separação, além de picos cromatográficos bem resolvidos (MOLDOVEANU *et al.*, 2017b; MCCALLEY, 2015).

Figura 3: Diagrama esquemático das interações ZIC-HILIC de Nglycan de 2-minopiridina sialilada. Interações eletrostáticas (atração e repulsão) e hidrofílicas entre o ácido siálico e o grupo de sulfobetaina na superfície da coluna ZIC. E^+ e E^- são íons eletrolíticos positivos e negativos (ex. íons amônio e acetato) no eluente, respectivamente (Adaptado de RABEL, 2013).



Esses diferentes mecanismos propiciam algumas vantagens à HILIC, nomeadamente a capacidade de promover uma maior retenção de compostos hidrofílicos e uma melhor separação dos mesmos comparativamente à RP-LC. Uma outra vantagem particular da HILIC relaciona-se com a diminuição da pressão do sistema. Essa vantagem resulta do alto conteúdo orgânico da fase móvel típica da HILIC e da baixa viscosidade resultante, refletindo deste modo numa redução da pressão no sistema. Um outro fator que tem impulsionado o emprego da HILIC está relacionada com o seu acoplamento à MS, especialmente quando se emprega o modo de ionização por

electrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*), uma vez que a fase móvel é mais eficientemente dessolvatada, dando origem a uma melhor sensibilidade do que quando se emprega a RP-LC (GUO *et al.*, 2013; HEATON *et al.*, 2014; LÓPEZ *et al.*, 2017; MCCALLEY, 2013; MCCALLEY, 2017b).

A menor viscosidade da fase móvel utilizada em HILIC resulta numa maior difusão do analito, dando origem a um menor valor do termo C (resistência à transferência de massa) da equação de Van Deemter, uma maior transferência de massa, o que poderá resultar num incremento da retenção dos analitos (HEATON *et al.*, 2014).

A Tabela 3 apresenta um resumo do emprego da LC na determinação de BAs em amostras de pescado.

Tabela 3: Emprego da LC na determinação de BAs em amostras de pescado.

Amostra	Analitos	Preparo de amostra	Técnica de determinação	Referência
Peixe	HIS ^a , TRY ^b , CAD ^c , PUT ^d , SPD ^e , SPM ^f , PHE ^g , TRP ^h	SLE ⁱ e SPE	LC -MS/MS Coluna: Synergi Hydro	(SAGRATINI <i>et al.</i> , 2012)
Sardinha	HIS, PUT, CAD, PHE, SPD, SPM, TRP, TYR	SLE, filtração e derivatização com cloreto de benzoílo	HPLC-UV ^l Coluna: STAR RP ^o 18	(ZARE <i>et al.</i> , 2017)
Frutos do mar	AGM ^j , CAD, HIS, PUT, TRP, TYR, PHE	MSPD ^k	UPLC-MS ^m Coluna: HILIC	(SELF <i>et al.</i> , 2012)
Derivados do pescado	HIS	SLE, agitação mecânica, e derivatização com cloreto de dansilo	HPLC-DAD ⁿ Coluna: C18	(SEMERARO <i>et al.</i> , 2016)
Anchova	AGM, HIS, TYR, PHE, SER, TRP, DOP, CAD, PUT, SPM, SPD	SLE, agitação mecânica e derivatização com cloreto de benzoílo	HPLC-DAD Coluna: RP ODS Hypersil	(OZOGUL <i>et al.</i> , 2017)
Atum	HIS, PUT, CAD, AGM, PHE, SPD, TRY, TYR	MSPD	UHPLC-MS ^p Coluna: Acquity UPLC BEH HILIC	(SELF <i>et al.</i> , 2011)

^a HIS, histamina do inglês *histamine*, ^b TRY, triptamina, do inglês *tryptamine*, ^c CAD, cadaverina, do inglês *cadaverine*, ^d PUT, putrescina, do inglês *putrescine*, ^e SPD, espermidina, do inglês *spermidine*, ^f SPM, espermina, do inglês *spermine*, ^g PHE, feniletilamina, do inglês *phenylethylamine*, ^h TRP, triptamina, do inglês *tryptamine*, ⁱ SLE, extração sólido-líquido, do inglês *solid liquid extraction*, ^j AGM, agmatine, do inglês *agmatine*, ^k MSPD, dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *matrix solid phase extraction*, ^l HPLC-UV, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector ultravioleta, do inglês *high performance liquid chromatography with ultraviolet detector*, ^m UPLC-MS, cromatografia líquida de ultraeficiência acoplado à espectrometria de massas, do inglês, *ultra performance liquid chromatography coupled mass spectrometer*, ⁿ HPLC-DAD, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos, do inglês *high pressure liquid chromatography with diode array detector*, ^o RP, fase reversa, do inglês *reverse-phase*.

Continuação da Tabela 3

Amostra	Analitos	Preparo de amostra	Técnica de determinação	Referência
Atum	HIS, PUT, CAD, AGM, PHE, SPD, TRY, TYR	MSPD	UHPLC-MS Coluna: Acquity UPLC BEH HILIC	(SELF <i>et al.</i> , 2011)
Peixe fresco e enlatado	HIS, PUT, CAD, AGM, PHE, SPD, SPM, TRP, TYR	SLE, agitação mecânica, e derivatização com ortoftaldeído	HPLC-FLD ^q Column: C18	(EVANGELISTA <i>et al.</i> , 2016)
Peixe enlatado	TRP, PUT, HIS, TYR, SPD	SLE, agitação mecânica, e derivatização com cloreto de dansilo	HPLC-UV/VIS ^t Coluna: Waters Spherisorb 5 Im ODS2	(SAAID <i>et al.</i> , 2009)
Peixe fresco	HIS, TYR, PHE, SER, TRP, DOP ^r , CAD, PUT, AGM, SPD	SLE e derivatização com ortoftaldeído	UHPLC ^u -FLD Coluna: Acquity UPLC BEH C18	(MORATALLA <i>et al.</i> , 2009)
Peixe fresco	PUT, CAD, SPD, SPM, PHE, HIS, TYR, TRP	USLE ^s e derivatização com etil-acridina-sulfonil cloreto	HPLC-FLD Coluna: Hypersil BDS C18	(LI <i>et al.</i> , 2014)
Produtos de peixe fermentado	AGM, HIS, TYR, PHE, SER, TRP, DOP, CAD, PUT, SPM, SPD	SLE, agitação mecânica e derivatização com cloreto de dansilo	HPLC-DAD Coluna: C18	(MOON <i>et al.</i> , 2010)

^p UHPLC-MS, cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, do inglês *ultra high performance liquid coupled mass spectrometer*, ^q HPLC-FLD, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por fluorescência, do inglês *high pressure liquid chromatography with fluorescence detector*, ^r DOP, dopamina, do inglês *dopamine*, ^s UAE, extração assistida por ultrassom, do inglês, *ultrasound assisted extraction*, ^t HPLC-UV/VIS, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector ultravioleta-visível, do inglês *high performance liquid with ultravioleta-visible detector*, ^u UHPLC-FLD, cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada ao detector por fluorescência, do inglês *ultra high performance liquid chromatograph with fluorescence detector*.

Continuação da Tabela 3

Amostra	Analitos	Preparo de amostra	Técnica de determinação	Referência
Peixe enlatado	ETM ^w , HEP ^x , HIS, ISM ^y , MEM ^z , PHE, PRO ^{aa} , PUT, TRP, TYM, CAD	UA-LLE ^{bb} Derivatização com naftaleno-2,3-dicarboxaldeído	HPLC-FLD Coluna: Inertsil ODS-3	(ZOTOU <i>et al.</i> , 2013)
Peixe	HIS, TYR, PHE, TRP, CAD, PUT, AGM, SPD, SPM	SLE e derivatização com cloreto de dansilo	HPLC-UV Coluna: C18	(AFLAKI <i>et al.</i> , 2015)
Peixe	HIS, TYR, CAD, PUT	SLE e derivatização com cloreto de dansilo	UPLC-DAD ^{cc} Coluna	(KRÍŽEK <i>et al.</i> , 2017)
Peixe	HIS, TYR, PHE, TRP, CAD, PUT, SPD, SPM	SLE e derivatização com cloreto de dansilo	HPLC-FLD Coluna: Kinetex C18	(HERRERO <i>et al.</i> , 2016)
Peixe	HIS, TYR, PHE, TRP, CAD, PUT, SPD, SPM	SLE, agitação mecânica, e derivatização com cloreto de dansilo	HPLC-DAD Coluna: C18	(KOSE <i>et al.</i> , 2012)
Peixe	HIS, TYR, PHE, TRP, CAD, PUT, SPD, SPM	SLE, agitação mecânica e derivatização com cloreto de benzoílo	UHPLC-MS/MS ^{dd} Coluna: ACQUITY HSS T3	(FU <i>et al.</i> , 2016)

^w ETM, etilamina, do inglês *ethylamine*, ^x HEP, heptilamina, do inglês *heptylamine*, ^y ISM, isoamilamina, do inglês *isoamylamine*, ^z MEM, metilamina, do inglês *methylamine*, ^{aa} PRO, propilamina do inglês *propylamine*, ^{bb} UA-LLE, extração líquido-líquido assistida por ultrassom, do inglês *ultrasound assisted liquid liquid extraction*, ^{cc} UPLC-DAD, cromatografia líquida de ultraeficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos, do inglês, *ultra performance liquid chromatography with diode array detector*, ^{dd} UHPLC-MS/MS, cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série do inglês *ultra high performance liquid chromatograph tandem mass spectrometry*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu em avaliar os métodos para determinação de BAs em amostras de pescado. Para a extração foi utilizada como técnica de preparo de amostra a USLE e para determinação a LC-MS/MS. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), da Escola de Química e Alimentos (EQA), na Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

4.1. Instrumentação

- Balança Analítica modelo FA 2104N, Bioprecisa (Curitiba, PR, Brasil);
- Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 – 1000 µL) Labmate (Varsóvia, Polônia);
- Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA);
- Agitador Vórtex modelo QL-901 (Biomixer, Brazil)
- Ultrassom Quimis modelo Q335D (Diadema, SP, Brasil);
- pHmetro modelo pH21 Hanna-Eletrodo de vidro combinado com BNC (Brasil)
- Centrífuga de tubos microprocessada modelo Quimis® Q222T (QUIMIS aparelhos científicos);
- Cromatógrafo a líquido *Alliance Separations* modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de degaseificação, acoplado a um espectrômetro de massas, Micromass® Quatro Micro™ API Waters, com fonte API, operado no modo de ionização por Eletrospray (ESI) e sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters;
- Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics Instruments Ltda., (Escócia).
- Coluna analítica Luna HILIC (100 mm x 3 mm d.i., 3 µm) (Phenomenex, Allcrom, SP, Brasil);
- Coluna analítica C18 XTerra (50 mm x 4,6 mm d.i., 3,5 µm) (Waters, Milford, Massachusetts, USA);
- Coluna analítica Atlantis HILIC silica (50 mm x 4,6 mm d.i., 3 µm) (Waters, Milford, Massachusetts, USA).

4.2. Reagentes, solventes e materiais

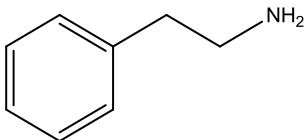
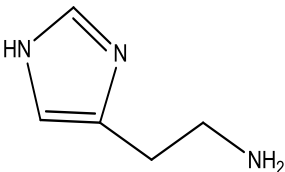
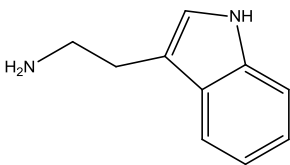
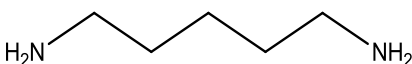
- Água Ultrapura, purificada em sistema Direct-Q UV3® Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm);
- Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, Mallinckrodt, NJ, USA);
- Metanol e etanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- Ácido perclórico 70% (HClO₄) (Vetec, RJ, Brasil);
- Ácido tricloroacético (Labsynth, Diadema, SP, Brasil);
- Hidróxido de sódio (NaOH) 2 mol L⁻¹;
- Ácido clorídrico 36,46% (HCl) ACS (Merck, RJ, Brasil);
- Ácido fórmico (HCOOH) pureza ≥ 98% (Merck, RJ, Brasil);
- Formiato de amônio (CH₅NO₂) pureza ≥ 99,0%, proveniente da Sigma Aldrich (SP, São Paulo, Brasil);
- Padrões analíticos (pureza superior a 99%): histamina, putrescina, cadaverina, feniletilamina, espermina, espermidina, pirrolidina, piridina, morfolina e triptamina foram provenientes da Sigma Aldrich (SP, São Paulo, Brasil);
- Kit filtração para fase móvel com membrana filtrante de nylon 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore, SP, Brasil);
- Tubos Falcon de polipropileno, capacidade de 5 e 10 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Gás argônio analítico 5.0 (Sapucaia, RS, White Martins, Brasil) usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS;
- C18 –Strata C18-E (50 µm) (Phenomenex, EUA);
- Quitina moída (produzida e caracterizada no Laboratório de Operações Unitárias da Escola de Química e Alimentos da FURG, a partir de resíduos de camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*);
- Quitosana em pó, na forma de gel, na forma de filme, esponja e quitosana misturada com carvão ativo (produzida e caracterizada no Laboratório de Operações Unitárias da Escola de Química e Alimentos da FURG, a partir de resíduos de camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*);
- Concha de mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) (obtido no Instituto de Oceanografia da FURG)
- Areia de Bujuru lavada;
- Alumina (proveniente da SIGMA ALDRICH)
- Amina primária secundária – PSA (40 µm) Bondesil (Varian, USA);
- Frascos de vidro âmbar (capacidade de 10 e 50 mL);

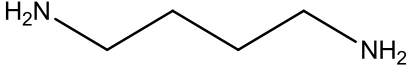
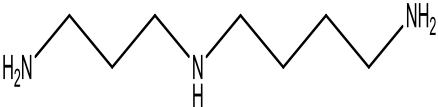
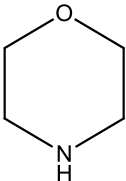
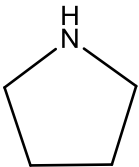
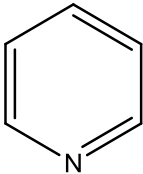
- Vidraria comum (balões volumétricos, pipetas volumétricas, béquer, etc).

4.3. BAs selecionadas para o estudo

Os analitos para este estudo foram previamente selecionados mediante uma revisão de literatura, reportando a sua ocorrência em amostras de pescado e considerando ainda a sua ocorrência em alimentos aliada à intoxicação, sendo eles histamina (HIS, do inglês *histamine*), putrescina (PUT, do inglês *putrescine*), cadaverina (CAD, do inglês *cadaverine*), feniletilamina (PHE), espermina (SPM, do inglês *spermine*), espermidina (SPD, do inglês *spermidine*), pirrolidina (PRL, do inglês *pyrrolidine*), piridina (PRD, do inglês *pyridine*), morfina (MOR, do inglês *morpholine*) e triptamina (TRP, do inglês *tryptamine*) (BIJI *et al.*, 2016; OZOGUL *et al.*, 2017; PARCHAMI, 2017; POHANISH, 2012; SENTELLAS, 2016). A Tabela 4 apresenta as estruturas das BAs selecionadas para o estudo, as propriedades físico-químicas e o número CAS.

Tabela 4: Valores de coeficiente de partição octanol-água (k_{ow}), pKa, número CAS, massa molar, fórmula molecular e estrutural das BAs selecionadas para o estudo (CHATZIMITAKOS *et al.* 2016; www.sigmaaldrich.com/brazil.html)

Nome e fórmula estrutural	Fórmula molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	pKa	Log _{k_{ow}}	Número CAS
Feniletilamina 	C ₈ H ₁₁ N	121,18	9,83	1,41	64-04-0
Histamina 	C ₅ H ₉ N ₃	111,15	9,7	-0,92	51-45-6
Triptamina 	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	160,22	10,2	1,38	61-54-1
Cadaverina 	C ₅ H ₁₄ N ₂	102,08	9,13	-0,43	462-94-2

Nome e fórmula estrutural	Fórmula molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	pka	Log _{kow}	Número CAS
Putrescina 	C ₄ H ₁₂ N ₂	88,15	10,8	-0,7	110-60-1
Espermina 	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	202,34	11,1	-1,35	71-44-3
Espermidina 	C ₇ H ₁₉ N ₃	145,25	10,9	-0,84	124-20-9
Morfolina 	C ₄ H ₉ NO	87,12	8,49	-0,86	110-91-8
Pirrolidina 	C ₄ H ₉ N	71,12	11,31	0,46	123-75-1
Piridina 	C ₅ H ₅ N	79,10	5,1	0,64	110-86-1

4.4. Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoque, contendo 10000 mg L⁻¹ dos padrões PUT e SPD e soluções estoque contendo 1000 mg L⁻¹ dos restantes compostos foram preparados pela dissolução dos padrões em HCl, considerando o grau de pureza. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar e armazenados em freezer.

A partir das soluções estoques de 1000 mg L⁻¹ e 10000 mg L⁻¹ foram preparadas soluções trabalho na concentração de 100 mg L⁻¹ de cada composto em HCl. Foi preparada uma solução trabalho na concentração de 1 mg L⁻¹, contendo uma mistura das BAs, que foram posteriormente utilizadas para a otimização das condições de detecção e separação empregando LC-MS/MS.

4.5. Limpeza da vidraria

Os materiais utilizados nesse estudo (vidraria, tubos de polipropileno, espátulas, frascos de vidro (balões volumétricos e etc.) foram lavados, inicialmente com água da torneira, seguido de enxágue com água destilada. Posteriormente o material foi mergulhado em detergente neutro 5% por 24 h e enxaguados com água da torneira, água destilada e com acetona. Os vials foram lavados com água da torneira e água destilada e colocados no banho de ultrassom com metanol 15%, após lavados com água destilada e rinsados com acetona. Em seguida foram secos em estufa a 50 °C, com exceção da vidraria volumétrica, e armazenados em ambiente limpo e fechado.

4.6. Otimização do sistema LC-MS/MS para determinação de BAs em amostras de pescado

4.6.1. Condições do espectrômetro de massas

Foram realizadas infusões diretas das soluções padrões individuais (HIS, CAD, PUT, SPM, SPD, MOR, PRD, PRL, TRP E PHE) com concentração de 1,0 mg L⁻¹ no espectrômetro de massas. Nesta etapa foi avaliado o modo de ionização (ESI positivo ou negativo); a voltagem do cone para selecionar o íon precursor; a energia de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos; a temperatura da fonte de ionização; a temperatura e a vazão do gás de dessolvatação para secagem do solvente e a voltagem do capilar.

4.6.2. Preparo da fase móvel

Os solventes utilizados foram preparados individualmente, filtrados a vácuo em membranas de nylon 0,45 μm . A água ultrapura e os solventes foram desgaseificados em ultrassom durante 30 min, a temperatura ambiente. A fase móvel foi armazenada em frascos próprios para solventes e rotulada.

4.6.3. Condições de separação no LC

Para a seleção das condições de separação das BAs foram empregadas diferentes colunas analíticas e diferentes composições de fase móvel descritas na Tabela 5, com eluição no modo gradiente. O volume de injeção foi de 10 μL .

Tabela 5: Condições para a separação de uma mistura de solução padrão das 10 BAs na concentração de 1 mg L^{-1} (ACN: acetonitrila, FA: ácido fórmico, AF: formiato de amônio, d.i: diâmetro interno)

Coluna analítica	Suporte	Funcionalização	Fase móvel A	Fase móvel B
C18 XTerra (50 mm x 4,6 mm d.i., 3,5 μm)	Sílica	C18	ACN+0,1% FA	0,1% FA em água ultrapura
Luna HILIC (100 mm x 3,0 mm d.i., 3,0 μm)	Sílica	Diol e éter	ACN+0,1% FA	0,1% FA e 10 mM AF em água ultrapura
				0,1% FA e 10 mM AF em água ultrapura
Atlantis HILIC Silica (50 mm x 4,6 mm d.i., 3,0 μm)	Sílica	Não derivatizada	ACN+0,1% FA	0,1% FA e 50 mM AF em água ultrapura
				0,1% FA e 100 mM de AF em água ultrapura
				0,1% FA em água ultrapura

A escolha da fase móvel adequada foi realizada avaliando-se o perfil de separação das BAs e a relação de partição ou fator de retenção, k , das diferentes colunas empregadas, calculada de acordo com CARR *et al.*, 2015. A escolha da vazão da fase móvel foi baseada na separação cromatográfica das soluções padrões, testando-se

vazões de 0,2 e 0,4 mL min⁻¹, sendo estas as vazões ideais para colunas de d.i. na faixa empregada (entre 3 e 4,6 mm) (CARR *et al.*, 2015; ISMAIL *et al.*, 2010; MEYER, 2004).

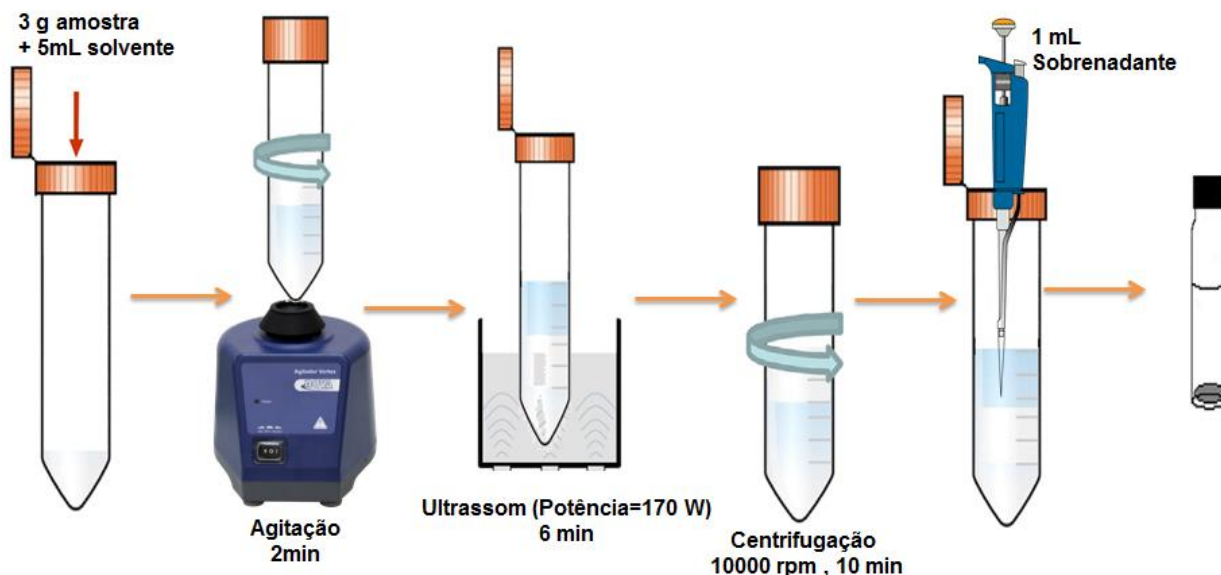
4.7. Amostras de pescado

Amostras de pescada (*cynoscion guatucupa*) foram utilizadas no desenvolvimento do método, sendo a mesma adquirida no mercado local da cidade do Rio Grande-RS, Brasil. É importante destacar que a comercialização do pescado no local não atende às condições ideais de refrigeração, além das insuficiências nas embarcações de captura, o que acelera os processos de degradação do pescado. Após a aquisição as amostras foram levadas ao laboratório onde foram submetidas a um processo de moagem, seguida de armazenamento em freezer a -18 °C.

4.8. Avaliação da USLE na extração de BAs em amostras de pescado

Os experimentos realizados durante a escolha das melhores condições para a extração de BAs empregando USLE seguiram as etapas descritas na Figura 4, onde são ilustradas as principais etapas do procedimento de extração. Todas as etapas foram realizadas em triplicata e cada replicata foi injetada 3 vezes no LC-MS/MS.

Figura 4: Sequência de etapas da USLE



4.8.1. Seleção do solvente extrator

Para a escolha do solvente, foram realizados experimentos utilizando 3 g de amostra de pescado fortificado com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ da mistura das BAs (numa concentração de $0,16 \text{ mg kg}^{-1}$) e 5 mL dos seguintes solventes: etanol, metanol, ácido tricloroacético (TCA) e o ácido perclórico (HClO_4). Na Tabela 6 são apresentadas os valores de pKa, viscosidade e polaridade dos solventes avaliados.

Tabela 6: Propriedades físico-químicas dos solventes avaliados (ALAM *et al.*, 2017; MCKEEN, 2006)

Solvente	pKa	Viscosidade (cP)	Polaridade
Etanol	15,54	1,203	4,3
Metanol	16	0,586	6,6
TCA	0,63	1,123	n.e*
HClO_4	-10	2,44	n.e*

n.e*: não encontrado

4.8.2. Solvente extrator acidificado

Após a seleção do solvente extrator, foi avaliado o efeito do solvente extrator acidificado na redução do efeito matriz, sendo realizado o ajuste do pH empregando TCA 5% e HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os experimentos realizados para a avaliação do pH seguem as etapas descritas na Figura 3.

4.8.3. Avaliação do efeito do sorvente na redução do efeito matriz

Foi avaliado nesta etapa o emprego da USLE seguida de uma etapa adicional de remoção de interferentes por d-SPE para a extração de nove BAs em tecidos de peixe. Foram avaliados materiais sorventes clássicos como o C18 (octadecilsilano), PSA (amina primária-secundária, do inglês *primary-secondary amine*) e alumina e os sorventes alternativos como quitina, quitosana, areia de Bojuru e concha de mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*). A Tabela 7 apresenta um comparativo entre os diferentes sorventes avaliados e a Tabela 8 a análise da areia feita por espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX, do inglês *energy dispersive x-ray spectroscopy*).

Os experimentos realizados para a avaliação do sorvente na redução do efeito matriz empregando USLE seguida da etapa de limpeza do extrato por d-SPE seguem as etapas descritas na Figura 5, onde após a etapa da extração, transfere-se 3 mL do sobrenadante obtido na etapa anterior para um tubo de 10 mL contendo 150 mg do sorvente. Agita-se o tubo durante 30 segundos com o objetivo de distribuir de forma uniforme o sorvente, seguido da centrifugação (3500 rpm por 5 min). Uma alíquota do extrato final foi retirada para a análise.

Figura 5: Esquema da USLE/d-SPE

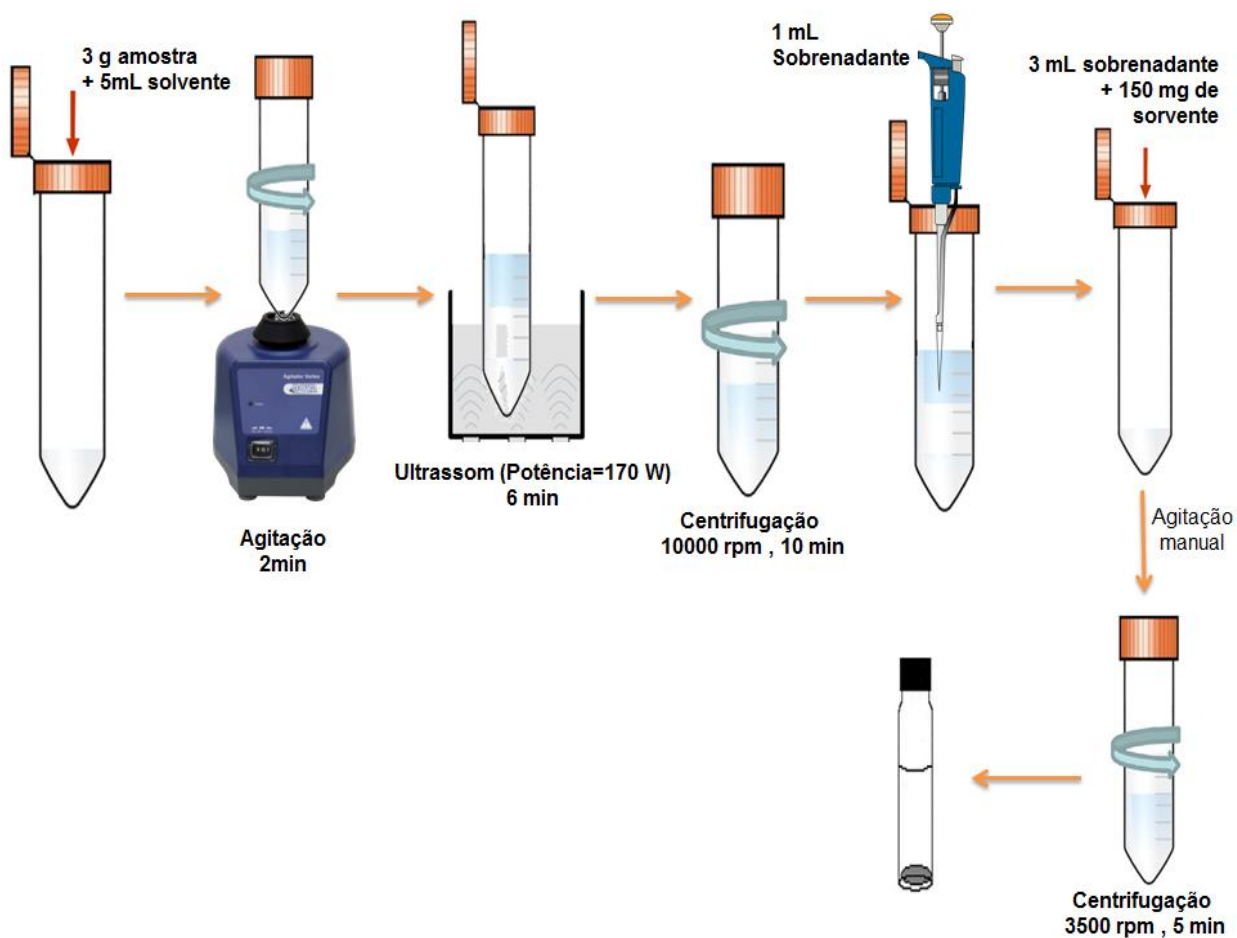


Tabela 7: Comparação dos sorventes empregados na limpeza do extrato (ARIAS *et al.*, 2014; <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/769290?lang=pt®ion=BR> ROMBALDI *et al.*, 2015)

Propriedades	Quitosana	PSA	C18	Concha de mexilhão	Quitina	Alumina
Preço por 100 g (R\$)	Não estimado	986	960	Não estimado	Não estimado	342
Tamanho de partícula (µm)	68	40	50	35	62 – 76	63
Área superficial (m ² g ⁻¹)	4,8	500	550	5		190
Disponibilidade	Fonte renovável	Sintética	Sintética	Fonte renovável	Fonte renovável	Sintética

Tabela 8: Análise EDX da areia da praia do bojuru (% atômico)

Amostras	C	O	Mg	Al	Si	Ti	Fe	Zr
Amostra 1	23,54	47,64		0,51	14,11	0,48		13,66
Amostra 2	22,20	47,78		0,23	14,49	0,22	0,31	14,77
Amostra 3	9,05	52,14	0,91	2,78	5,43	17,08	12,27	
Amostra 4	12,11	44,64	1,22	1,16	1,39	22,72	16,02	
Amostra 5	18,83	56,35		0,32	12,00	0,38	0,32	11,81
Amostra 6	11,13	47,86	0,35	0,76	1,02	24,08	13,29	
Amostra 7	10,62	48,01		0,68	1,77	21,59	15,03	
Amostra 8	16,57	51,25		0,24	31,45	0,19	0,30	
Amostra 9	7,97	60,06	0,31	1,04	1,22	18,11	10,75	
Amostra 10	23,54	47,64		0,51	14,11	0,48		13,66
Média Bojuru	15,56	50,34	0,28	0,82	9,70	10,53	6,83	5,3

4.8.4. Avaliação do pH

Foi avaliado o efeito do pH na redução do efeito matriz, sendo empregado solvente acidificado a pH 2 e 4 e alcalinizado a pH 8 e 12, com ajuste utilizando hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ quando necessário aumento no valor de pH e HCL 0,1 mol L⁻¹ quando necessária acidificação. Os experimentos realizados para a avaliação do pH seguem as etapas descritas na Figura 3.

4.8.5. Avaliação do efeito do sorvente em pH 12

Nesta etapa foi avaliado a capacidade de remoção de co-extrativos da quitina, areia e C18 quando empregadas num meio cujo solvente extrator é alcalinizado a pH 12. A sequência de etapas para teste teste foram realizadas conforme mostra a Figura 4.

4.8.6. Efeito do solvente a pH 12 seguido da acidificação do extrato

Com o intuito de reduzir a interferência das proteínas e aminoácidos na detecção das BAs, foi realizado a extração empregando um solvente extrator alcalinizado a pH 12 para precipitar os aminoácidos, mediante as etapas descritas na Figura 3, seguido da acidificação do extrato obtido a pH 4 para promover a precipitação das proteínas. Uma alíquota do extrato final foi retirada para a análise.

4.9. Quantificação das amostras

Na etapa de desenvolvimento, as recuperações foram calculadas através da relação entre as áreas dos padrões no extrato com as áreas dos analitos obtidas após extração, mediante a expressão indicada na equação 1.

$$\%R = \frac{\text{Área da extração}}{\text{Área do padrão no extrato}} * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.10. Tratamento estatístico dos dados

Para avaliação dos resultados de recuperação e efeito matriz durante a otimização do método, foram realizadas análises de variância (ANOVA), com teste de *post-hoc* de Tukey realizado com o auxílio do programa Statistica®, versão 5.0 - Statsoft Inc.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. Otimização das condições de detecção no espectrômetro de massas

As condições para a fragmentação dos íons monitorados foram: temperatura da fonte de ionização de 100 °C, temperatura do gás de dessolvatação de 400 °C, vazão do gás de dessolvatação de 500 L h⁻¹, vazão do gás do cone de 50 L h⁻¹ e voltagem do capilar de 4 kv.

A Tabela 9 apresenta as BAs monitoradas por LC-MS/MS no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*), o modo de ionização (ESI+), a voltagem do cone, a energia de colisão e as transições monitoradas. Para cada analito, foram selecionadas duas transições características, o fragmento mais intenso foi utilizado para a quantificação e o segundo mais intenso para a identificação dos mesmos.

Tabela 9: Condição de fragmentação das BAs no LC-MS/MS, com modo de ionização ESI+, transições monitoradas, voltagem do cone e energia de colisão.

Analitos	Transição	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
CAD	103>86 ^a	25	14
	103>69	25	14
HIS	111,9>68	15	20
	111,9>95 ^a	15	45
MOR	88>69,8 ^a	8	5
PHE	122>105 ^a	10	10
	122>77	20	27
PUT	88,9>55,01	22	13
	88,9>72 ^a	9	7
PRD	80,04>27	44	17
	80,04>53 ^a	40	23
PRL	72,1>30,1 ^a	32	9
	72,1>55,3	32	23

Analitos	Transição	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
SPM	202,9>112,1 ^a	20	20
	202,9>129	20	15
SPD	146>72 ^a	26	24
	146>112	26	24
TRP	160,8>144 ^a	10	10
	160,8>117	10	22

^a transições empregadas para a quantificação

5.2. Otimização do sistema cromatográfico para determinação das BAs

Para a separação das BAs foram empregadas as colunas analíticas C18 XTerra, Luna HILIC e Atlantis HILIC sílica, com fase móvel composta por acetonitrila e água. Considerando que a estabilidade das colunas compostas por sílica é comprometida com o aumento do pH e atendendo ao fato das BAs serem compostos ionizáveis, foram empregados como aditivos químicos o ácido fórmico e formiato de amônio (LÓPEZ *et al.*, 2017; MOLDOVEANU *et al.*, 2017a).

5.2.1. Coluna C18 XTerra

Foram avaliadas diferentes condições de eluição no modo gradiente quando empregada a coluna C18 XTerra, variando o tempo de análise e a força de eluição, entretanto foi observado uma baixa retenção dos analitos, o que está relacionado com a natureza polar das BAs (GOSETTI *et al.*, 2013; JANDERA, 2011; KONIECZNA *et al.*, 2016; LÓPEZ *et al.*, 2017).

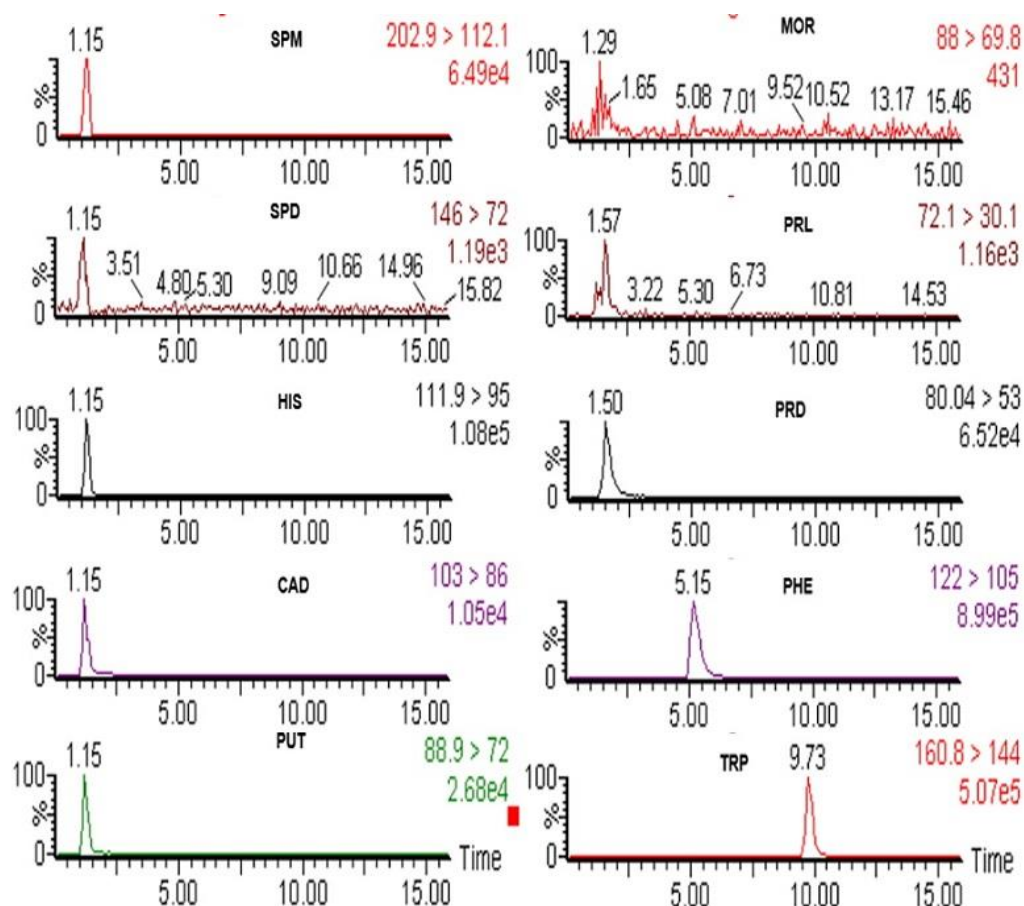
A retenção de compostos polares no modo RP-LC geralmente requer uma grande quantidade de água na fase móvel para favorecer uma maior retenção dos compostos na fase estacionária (SILVA *et al.*, 2016). Neste sentido diminuiu-se a força de eluição (aumento na quantidade de água), o que por sua vez, apresentou efeito apenas para os compostos menos polares (PHE e TRP). Os demais compostos eluíram na faixa de 1 a 2 minutos. Vale ressaltar ainda, que um aumento na quantidade de água na fase móvel pode ocasionar diminuição na sensibilidade do LC-MS quando empregado o modo de ionização por ESI, além da possibilidade de ruptura da estrutura da superfície da fase estacionária (IBRAHIM *et al.*, 2013). A Tabela 10 apresenta uma das condições de separação empregadas, e o cromatograma no modo SRM referente a esta condição

encontra-se na Figura 6.

Tabela 10: Condição de eluição empregada no modo gradiente usando a coluna C18 Xterra (FA: ácido fórmico)

tempo (min)	Água ultrapura com 0,1% FA	Acetonitrila com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	98	2	0,2
10	85	15	
11	98	2	
16	98	2	

Figura 6: Cromatograma no modo SRM para a mistura de 10 BAs na concentração de 1,0 mg L⁻¹ nas condições ilustradas na Tabela 10



Como pode ser observado na Figura 6, mesmo empregando um gradiente com força de eluição baixa (98% de fase aquosa), a maioria das BAs não apresentaram interação com a fase estacionária, eluindo no tempo morto. A polaridade das BAs restringe a aplicabilidade RP-LC para a sua separação. Neste sentido, o emprego da HILIC é uma alternativa ao RP-LC para a separação das BAs, por promover uma maior

retenção e eficiência de separação destes analitos, além da diminuição da pressão no sistema, devido à menor viscosidade da fase móvel empregada, uma vez que se usa alta concentração de solvente orgânico (GUO *et al.*, 2013; KONIECZNA *et al.*, 2016; LOPEZ *et al.*, 2017; IBRAHIM *et al.*, 2013). Em função disso, com o intuito de melhorar a retenção e a separação das BAs, foram empregadas as colunas Luna e Atlantis HILIC.

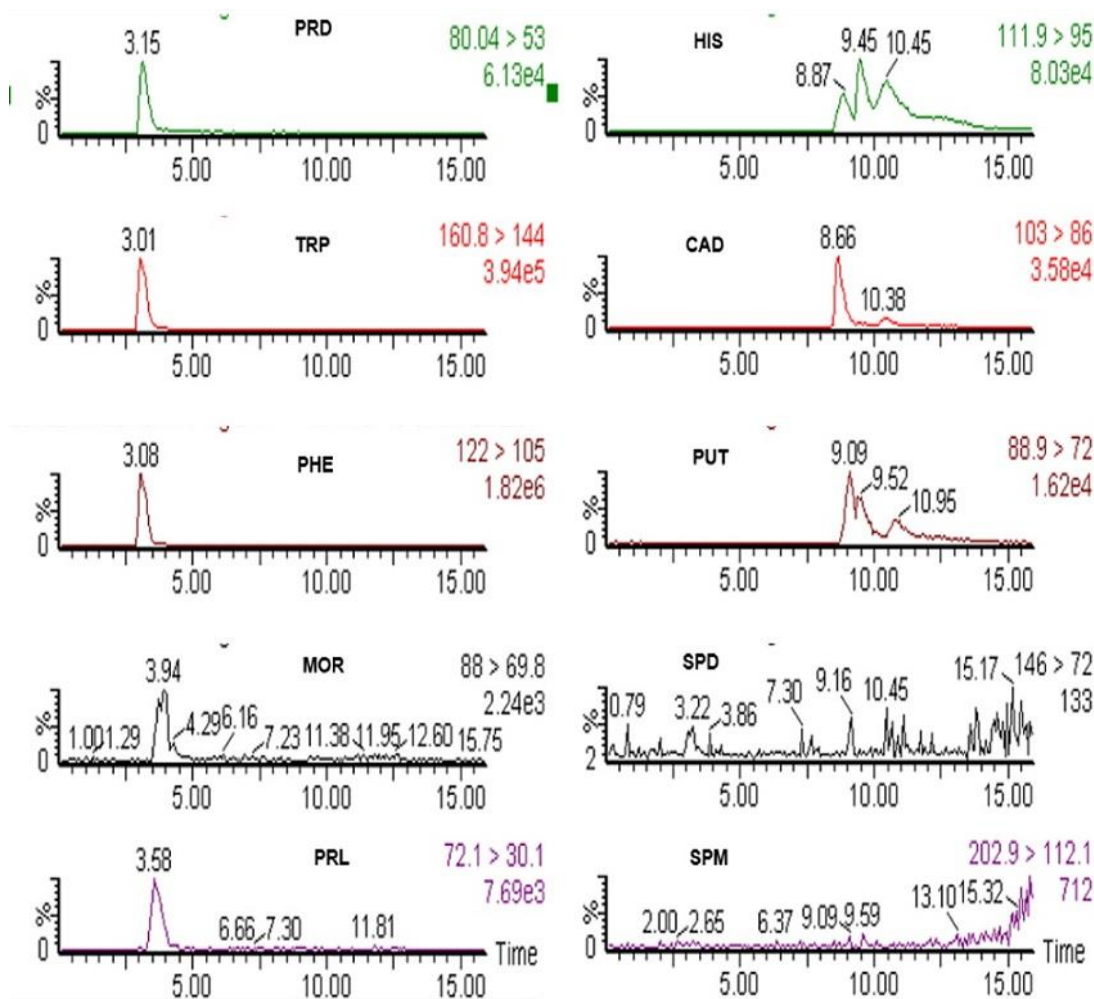
5.2.2. Coluna Luna HILIC

Diferentes condições de eluição no modo gradiente foram avaliados, sendo elas enumeradas nas Tabelas de 29 a 33 do Anexo, variando-se o tempo de análise, força de eluição e a polaridade da fase móvel. Foi observado uma maior retenção dos analitos, comparativamente à coluna C18 XTerra. A fase estacionária utilizada na coluna Luna HILIC baseia-se em ligações de éter e diol quimicamente ligado à sílica, o que lhe confere uma elevada polaridade e as propriedades apropriadas para a formação de ligações de hidrogênio, e, por conseguinte, poderá ter contribuído para uma maior retenção das BAs (IBRAHIM *et al.*, 2013). Essa maior retenção é atribuível também à formação de camada de água na superfície da sílica, o que facilita a transferência dos compostos para a fase estacionária e uma maior retenção (IVERSON *et al.*, 2016; MCCALLEY, 2013; MCCALLEY, 2015), o que foi constatado na Figura 7 do referente estudo. A Tabela 11 apresenta as condições de eluição referente ao cromatograma da Figura 7.

Tabela 11: Condição de eluição usando a coluna Luna HILIC (FA: ácido fórmico; AF: formiato de amônio)

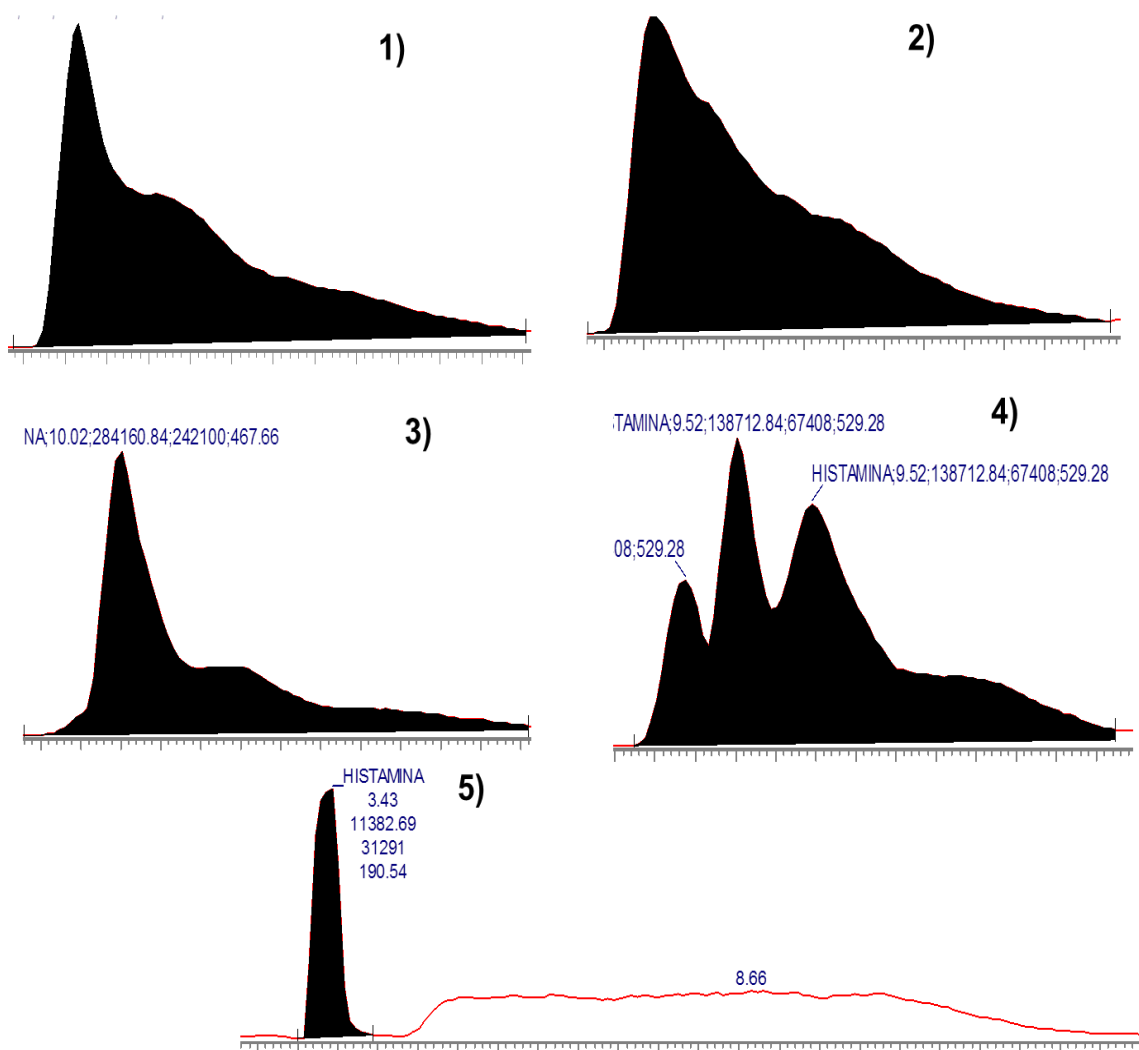
tempo (min)	Água ultrapura com 0,1% FA + 10 mM AF	Acetonitrila com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	10	90	0,2
10	90	10	
12	100	0	
15	100	0	
16	10	90	
21	10	90	

Figura 7: Cromatograma no modo SRM para a mistura de 10 BAs na concentração de 1,0 mg L⁻¹ nas condições ilustradas na Tabela 11



Embora o emprego da coluna Luna HILIC ter proporcionado uma maior retenção das BAs, mesmo avaliando diferentes composições da fase móvel, ainda há compostos que eluem no mesmo tempo de retenção, além de problemas inerentes ao perfil cromatográfico dos picos, conforme pode ser observado na Figura 8 o perfil dos picos relativamente à HIS nas diferentes condições avaliadas (Tabelas de 29 a 33 do Anexo). Distorções como caudas, alargamentos e a subdivisão foram algumas das irregularidades observadas com relação ao formato dos picos.

Figura 8: Formato dos picos da HIS nas diferentes condições empregadas (1-5)



Fatores relacionados ao tamponamento inadequado da fase móvel, existência de resíduos de metais na fase estacionária, bem como grupos silanóis residuais (Si-OH) podem ter inferido nestes resultados, conforme já mencionado por MCCALLEY, 2013 e MOLDOVEANU *et al.*, 2017b (MCCALLEY, 2013; MOLDOVEANU *et al.*, 2017b). Estas irregularidades com relação ao formato dos picos também podem estar atreladas às impurezas metálicas no solvente empregado no preparo dos padrões (HCl 0,1 mol L⁻¹).

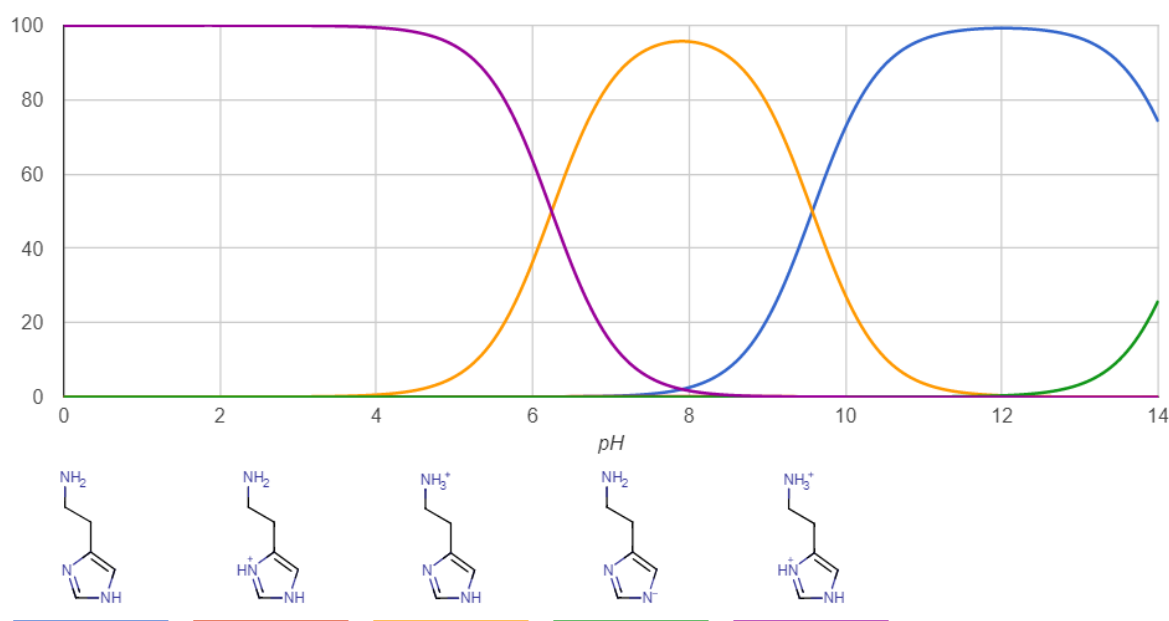
A fase estacionária empregada na coluna Luna HILIC contém grupos silanóis e de acordo com o manual do fabricante, esta coluna não passou pelo processo de capeamento ou bloqueio dos grupos silanóis. Este não recobrimento dos grupos silanóis residuais do suporte pode ter resultado em interações indesejáveis dos grupos silanóis do suporte com as BAs (interação iônica e formação de ligações de hidrogênio), e consequente deterioração do perfil cromatográfico dos picos (GUO *et al.*, 2013; IVERSON *et al.*, 2016).

A presença de metais aumenta consideravelmente a acidez dos grupos silanóis. Este fato torna-se um inconveniente na análise de BAs por serem compostos básicos, o que pode resultar na forte interação destas com os grupos residuais ácidos não recobertos pelo capeamento. Portanto, a presença de metais na matriz de sílica ou ainda a presença de resíduos de metais no HCl utilizado no preparo dos padrões das BAs pode ter resultado no incremento da acidez dos grupos silanóis, favorecendo deste modo a sua interação com as BAs, sendo provável que estas possíveis interações sejam a causa da retenção atípica das BAs (IBRAHIM *et al.*, 2013).

Considerando que as BAs são compostos ionizáveis, é recomendado que a fase móvel seja tamponada de forma a controlar o pH e estabilizar a carga dos analitos e dos grupos da fase estacionária. Entretanto, apesar da fase móvel ser composta por 10 mM de formiato de amônio, é provável que o mesmo tenha tido pouca capacidade de tamponamento, resultando na ionização dos analitos ou desprotonação dos grupos silanóis, cuja interação resulta em distorções do formato dos picos. Por outro lado, o emprego de HCl no preparo dos padrões analíticos pode ter influenciado na eficiência de tamponamento do formiato de amônio, uma vez que apesar da fase móvel com 10 mM de formiato de amônio possuir um pH de 3,20, é possível que esse pH tenha sofrido flutuações em função da acidez das soluções nas quais se encontram os analitos, resultando no aumento da acidez dos grupos silanóis e possíveis interações com as BAs e deformação do perfil cromatográfico dos picos (BUSZEWSKI *et al.*, 2012; JANDERA, 2011; MCCALLEY 2013).

Um outro fator que também pode ter resultado no alargamento dos picos cromatográficos e perda da simetria seria a presença das BAs em diferentes formas iônicas, resultado das flutuações do pH devido à ineficiência de tamponamento de 10 mM de formiato de amônio (BUSZEWSKI *et al.*, 2012; JANDERA, 2011; SILVA *et al.*, 2016). A Figura 9 ilustra a distribuição das espécies de HIS em diferentes valores de pH.

Figura 9: Distribuição das espécies da HIS vs pH (<https://chemicalize.com/#/calculation>)



Tendo em conta os problemas inerentes ao perfil cromatográfico dos picos e o perfil de separação obtido empregando a coluna Luna HILIC, foi avaliado a separação das BAs empregando a coluna a Atlantis HILIC que também envolve interações hidrofílicas.

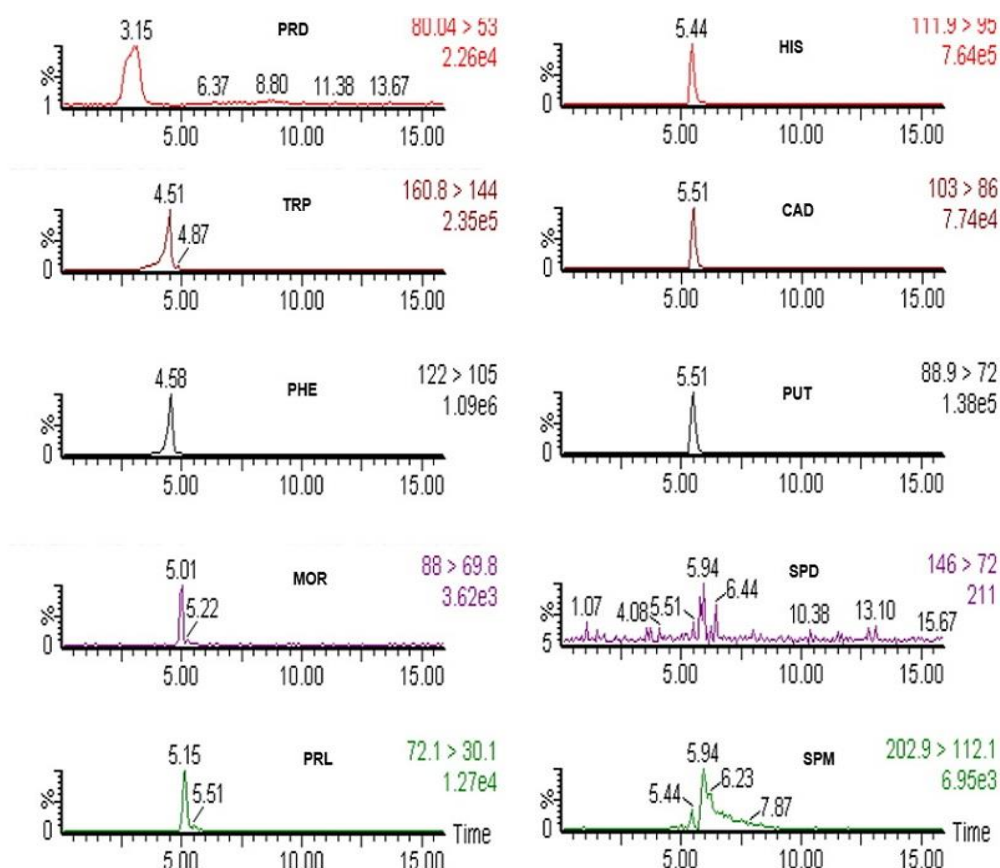
5.2.3. Coluna Atlantis HILIC

A fase estacionária utilizada na coluna Atlantis HILIC é composta por sílica pura, o que é uma vantagem sobre as colunas de fase ligada, especialmente para sistemas LC-MS, devido à ausência de ligantes, que poderiam sofrer uma ruptura, lixiviar da coluna e criar sinais hipotéticos no espectro de massas (GUO *et al.*, 2013; IBRAHIM *et al.*, 2013; KOUPPARIS *et al.*, 2013). Foi avaliado igualmente para esta coluna diferentes condições de eluição no modo gradiente (Tabelas de 34 a 38 do Anexo), variando o tempo de análise e a força de eluição. A Tabela 12 apresenta umas das condições empregadas no modo gradiente e a Figura 10 o cromatograma no modo SRM referente a esta condição.

Tabela 12: Condição de eluição empregando a coluna Atlantis HILIC (FA: ácido fórmico; AF: formiato de amônio)

tempo (min)	Água ultrapura com 0,1% FA + 10 mM AF	Acetonitrila com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	10	90	0,4
2	80	20	
5	80	20	
5,5	10	90	
10	10	90	

Figura 10: Cromatograma no modo SRM para a mistura de 10 BAs na concentração de 1,0 mg L⁻¹ nas condições ilustradas na Tabela 12



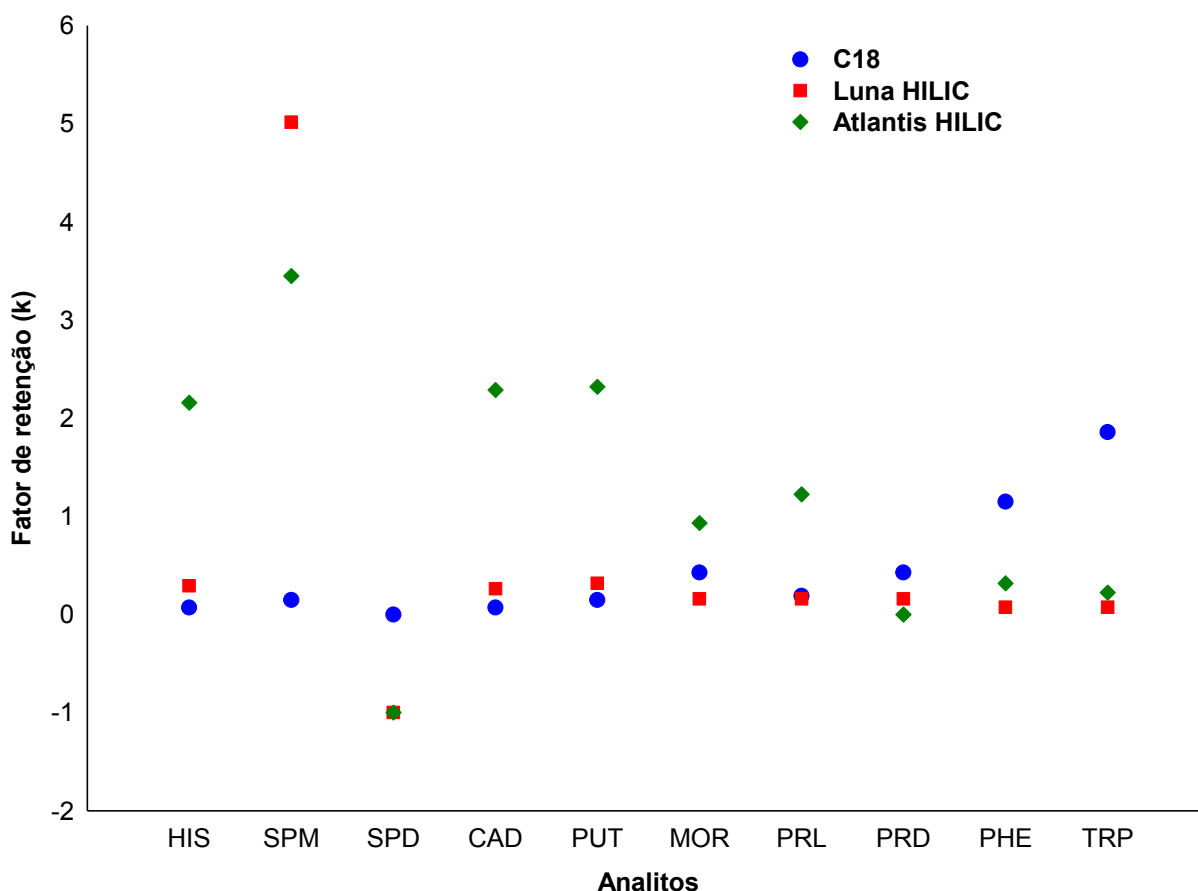
A maior polaridade da fase estacionária empregada na coluna Atlantis HILIC proporcionou uma maior retenção das BAs pelos diversos mecanismos que regem a cromatografia por interação hidrofílica, sendo eles interações eletrostáticas, interações por ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo ou ainda o equilíbrio de partição hidrofílico (ALPERT, 1990; GRITTI *et al.*, 2015; HEATON *et al.*, 2014; IVERSON *et al.*,

2016; IBRAHIM *et al.*, 2013; MCCALLEY, 2015). No entanto, apesar do maior fator de retenção desta coluna, alguns compostos como HIS, PUT e CAD eluíram no mesmo tempo de retenção.

A polaridade das fases diol é bastante semelhante à da sílica pura (IBRAHIM *et al.*, 2013), entretanto, a fase estacionária baseada apenas em sílica apresentou uma maior retenção para a maioria dos analitos, conforme mostram os valores do fator de retenção (*k*) da Figura 11. É provável que haja uma camada de água mais extensa na coluna de sílica devido à maior concentração dos grupos silanóis em comparação com as fases de sílica ligada ao grupo diol, tendo proporcionado deste modo uma maior retenção dos analitos. Por outro lado, a acidez dos silanóis é afetada pela pureza da própria sílica. A sílica utilizada como fase estacionária na coluna Atlantis HILIC é uma sílica do tipo A, cuja superfície possui caráter ácido devido à contaminação por metais (Al^{3+} e Fe^{3+}) que ativam grupos silanóis da superfície mediante a remoção de elétrons dos átomos de oxigênio. Estes metais podem formar complexos com os analitos, o que ocasiona uma maior retenção (MCCALLEY, 2017a). A presença de resíduos de Fe^{3+} no HCl empregado no preparo dos padrões das BAs também pode ter contribuído para uma maior acidez dos grupos silanóis e provavelmente uma maior interação com as BAs, refletindo deste modo num incremento dos valores de *k*.

A Figura 11 apresenta um comparativo entre o fator de retenção das colunas do modo HILIC com a coluna no modo RP-LC. As colunas hidrofílicas apresentaram um maior fator de retenção, exceto para a PRD, PHE e TRP pelo fato destes compostos serem mais apolares, apresentando uma maior afinidade pela fase estacionária empregada no modo RP-LC.

Figura 11: Fator de retenção (k) para os analitos em função da fase estacionária



As melhores condições de separação foram obtidas empregando a coluna Atlantis HILIC. No entanto, em HILIC, a camada de água protege a superfície da sílica, mas não previne completamente a interação dos analitos polares com os grupos silanóis residuais, o que faz com que esteja associado a problemas inerentes ao perfil cromatográfico dos picos. Isto foi observado empregando as colunas HILIC, provavelmente resultado da presença dos grupos silanóis, de impurezas metálicas presentes na sílica, e provavelmente do tamponamento inadequado da fase móvel (IBRAHIM *et al.*, 2013). Em função disso foram avaliados diferentes concentrações do tampão na fase móvel de modo a avaliar o seu efeito no formato dos picos.

5.2.3.1. Efeito do pH e da concentração do tampão no formato dos picos

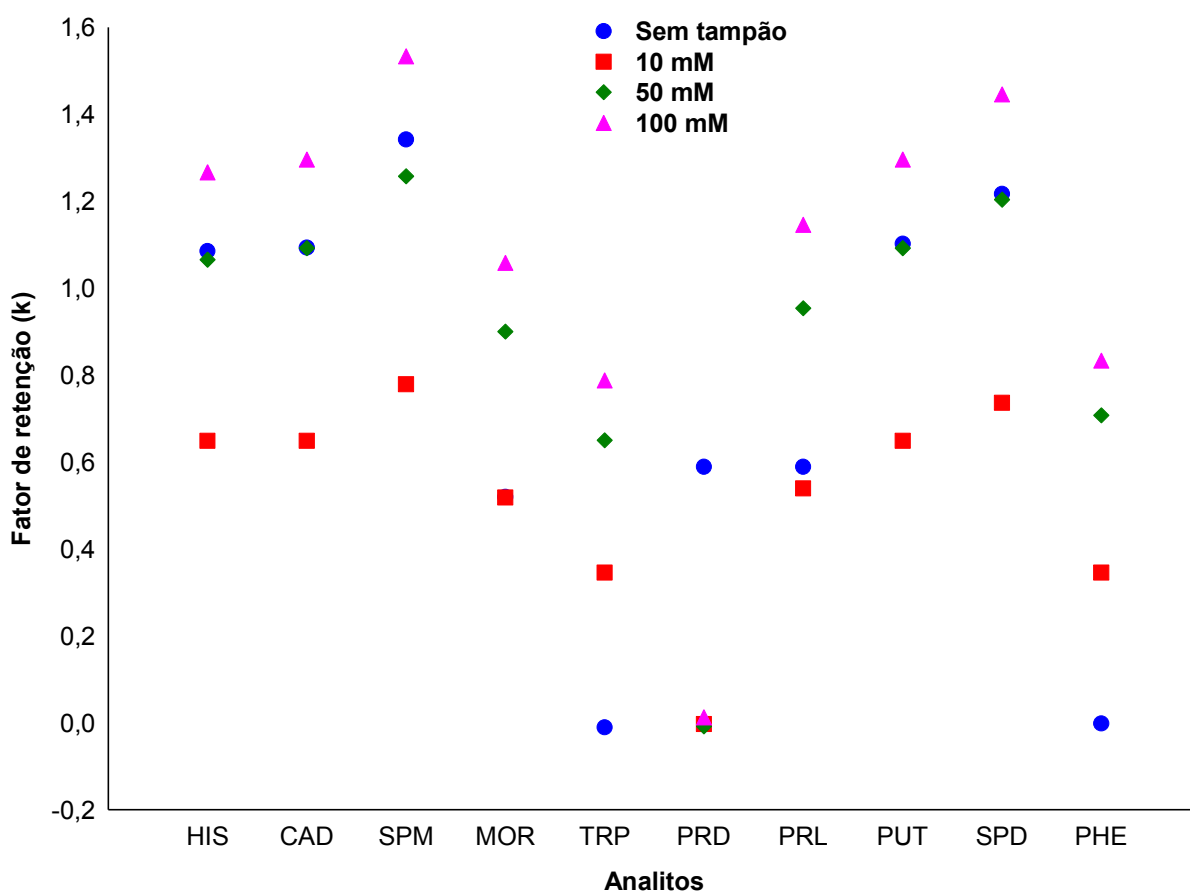
Para espécies ionizáveis, as interações eletrostáticas têm um efeito significativo na retenção e seletividade alterando o estado de ionização de analitos e da fase estacionária na HILIC. Dependendo das cargas dos analitos e da fase estacionária, essas interações podem ser atrativas ou repulsivas, sendo, o pH e a composição da fase móvel fatores cruciais para alcançar as melhores condições de separação, detecção e

perfil cromatográfico dos picos. Daí a importância do ajuste do pH, resultando em métodos mais reprodutíveis e robustos (GUO *et al.*, 2013; MACCALLEY, 2013; SILVA *et al.*, 2016). Foram avaliadas diferentes concentrações de formiato de amônio na fase móvel, sendo elas 10, 50 e 100 mM, e fase móvel isenta do tampão.

A utilização da fase móvel sem o tampão (menor pH) uma fraca retenção das BAs comparativamente às análises empregando fase móvel tamponada, sendo que o fator de retenção aumentou com o aumento da concentração do tampão, sendo possível observar de forma mais nítida essa diferença comparando os resultados da k quando não se emprega tampão ou quando se usa 10 mM com k da fase estacionária com a fase móvel tamponada com 100 mM de formiato de amônio (Figura 12). De acordo com GUO *et al.*, 2013, os grupos silanóis tornam-se desprotonados ou carregados negativamente a valores de pH mais elevados. Os compostos básicos carregados positivamente têm uma maior atração eletrostática pelos grupos silanóis carregados negativamente, além da interação hidrofílica, resultando numa maior retenção. Portanto, essa maior retenção das BAs quando utilizado fase móvel tamponada pode ser atribuída ao incremento das interações eletrostáticas entre estes e os grupos silanóis desprotonados. Este comportamento também pode estar relacionado com o aumento do volume da camada aquosa retida na superfície da fase estacionária devido a uma maior concentração de sal, e consequentemente um maior número de íons solvatados, resultando numa maior partição (efeito *salting-out*) de analitos na fase estacionária e um aumento na retenção (MACCALLEY, 2017b).

Em contrapartida, à medida que se aumenta a concentração do tampão, a repulsão eletrostática entre a fase estacionária e os analitos é enfraquecida pelo aumento da concentração de sal, o que leva a uma maior retenção. Deste modo, o aumento do pH proporcionado pela adição do tampão (ex. de pH=2,71 para pH=4,31 quando se adiciona 100 mM de formiato de amônio), promove uma blindagem iônica dos grupos silanóis que possam estar carregados positivamente, o que reduz a repulsão eletrostática entre estes e as BAs carregadas positivamente, evidenciado pelo aumento do fator de retenção da coluna quando empregada fase móvel tamponada (IVERSON *et al.*, 2016; KOUPPARIS *et al.*, 2013; MACCALLEY, 2017b).

Figura 12: k para os analitos em função da concentração do tampão



Foi constatado ainda que, o uso da fase móvel isenta de formiato de amônio (pH=2,71) originou picos pouco intensos (menor área) comparativamente à fase móvel tamponada (Figura 13), provavelmente devido à fraca capacidade de troca iônica da fase estacionária. Além disso, os picos obtidos empregando fase móvel não tamponada apresentaram distorções, o que também pode ser observado no perfil cromatográfico (i) da Figura 13. Essas distorções podem estar relacionadas com interações eletrostáticas dos analitos com os grupos da fase estacionária (Si-OH), resultando deste modo numa forte retenção e provável deformação do formato dos picos (IVERSON *et al.*, 2016).

A Figura 13 apresenta o perfil cromatográfico da PHE utilizando fase móvel com diferentes concentrações de tampão (10 mM, 50 mM e 100mM) enumeradas por (i), (ii), (iii) e fase móvel isenta de tampão (iv) sendo possível constatar melhorias em termos de formato dos picos quando se emprega tampão. Estes resultados podem estar relacionados com a maior força iônica das soluções que contêm sais em comparação com soluções com apenas ácido fórmico (GUO *et al.*, 2013; MCCALLEY, 2015). Contudo, é provável que a fase móvel preparada com 10 mM de tampão (pH=3,20) tenha apresentado pouca capacidade de tamponamento, pois problemas relacionados ao

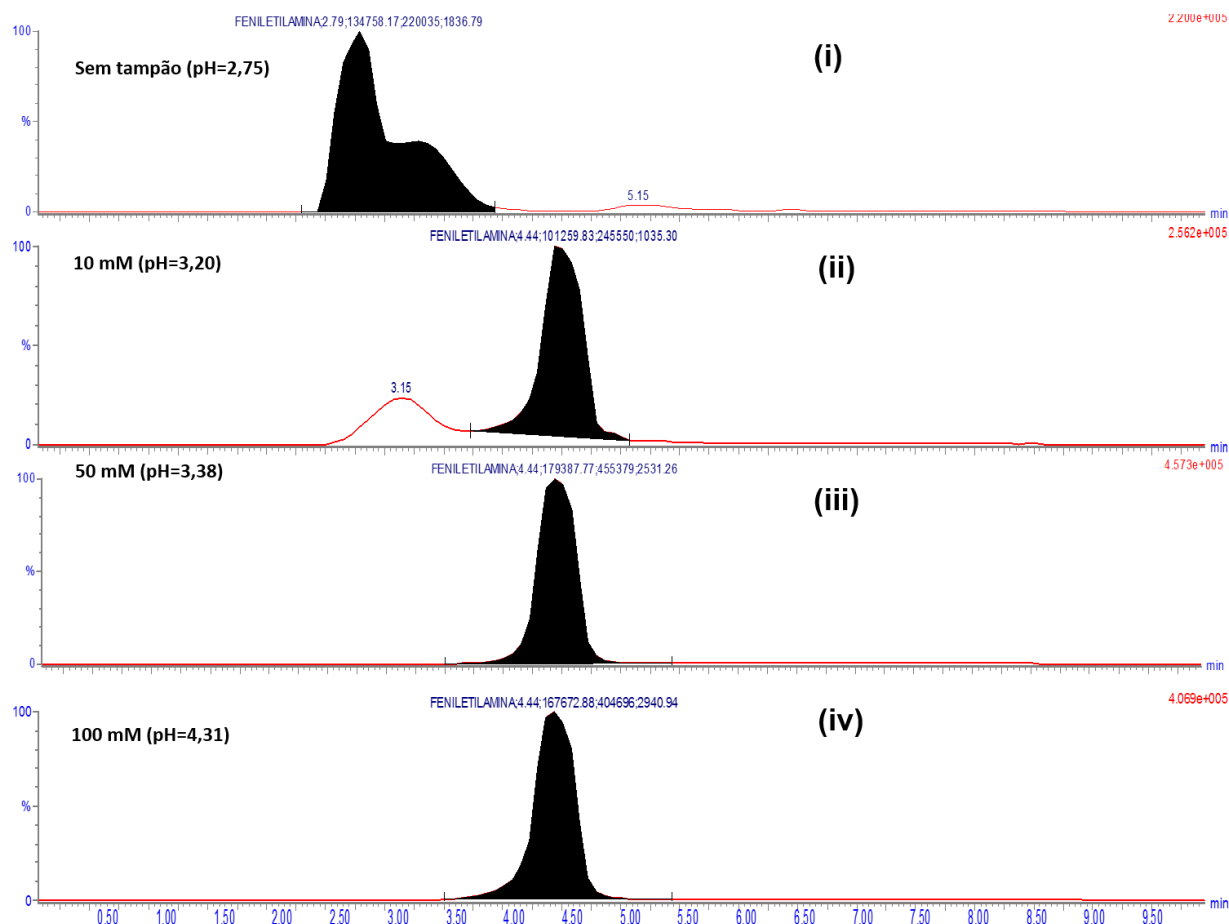
formato dos picos também foram observados empregando esta concentração de formiato de amônio, conforme mostra o perfil cromatográfico (ii) da Figura 13. Segundo BUSZEWSKI *et al.*, 2012 e JANDERA, 2011 formas iônicas mistas dos analitos durante a separação, podem resultar em alterações na cinética de sorção e dessorção dos analitos, originando distorções no perfil cromatográfico dos picos. Deste modo, é provável que o emprego de HCl no preparo dos padrões tenha inferido na eficiência de tamponamento do formiato de amônio, acarretando em variações do intervalo de pH e a possibilidade de ter BAs em diferentes formas iônicas, e por conseguinte, deformações no formato dos picos. Por outro lado, o HCl também pode ter aumentado a acidez do grupos silanóis, o que favorece a sua interação com as BAs, podendo resultar em deformações no formato dos picos (BUSZEWSKI *et al.*, 2012; JANDERA, 2011).

Resultados empregando fase móvel tamponada com 50 mM de formiato de amônio (pH=3,38) evidenciaram um melhor formato dos picos (perfil cromatográfico (iii) da Figura 13) e uma maior retenção comparativamente ao emprego de fase móvel isenta de tampão e com 10 mM de formiato de amônio. Além disso, o emprego de fase móvel tamponada com 50 mM de formiato de amônio possibilitou um aumento da área de todos os compostos analisados. Estes resultados em termos do perfil cromatográfico dos picos, aumento da área e da retenção da fase estacionária podem ser devido à maior força iônica da fase móvel contendo sais e o efeito concorrente dos cátions do tampão com íons das BAs nos silanóis ionizados da fase estacionária, resultando numa melhora no formato dos picos. O incremento da área também pode estar relacionado com o aumento da ionização dos grupos silanóis a um pH mais elevado. Nestas condições a troca iônica pode desempenhar um papel significativo na retenção, especialmente de compostos básicos carregados positivamente, como é o caso das BAs, que podem ter tido fortemente retidas na fase estacionária por interações de troca iônica (MCCALLEY 2015; MCCALLEY 2017b).

Um aumento no pH da fase móvel devido ao aumento da concentração do formiato de amônio para 100 mM (pH=4,31) originou picos pouco intensos (menor área) comparativamente aos obtidos empregando fase móvel tamponada com 50 mM de formiato de amônio. É provável que esse aumento do pH tenha resultado na diminuição da ionização do analito, o que reduz a retenção iônica, podendo ter resultado numa menor área. Essa menor retenção das BAs poderá ser atribuída ainda à reduzida solubilidade desses compostos não carregados na camada de água imobilizada na

superfície, refletindo numa menor retenção, e consequentemente uma menor área (MCCALLEY 2015; MCCALLEY 2017).

Figura 13: Perfil cromatográfico dos picos da PHE quando avaliado diferentes concentrações do tampão



É recomendável que a fase móvel contenha tampão pelo papel que exerce no fator de retenção da fase estacionária, mas sobretudo por sua contribuição na melhoria do formato dos picos, especialmente para compostos ionizáveis e quando se emprega fase estacionária com funcionalidades iônicas (MOLDOVEANU *et al.*, 2017a).

5.3. Extração sólido-líquido assistida por ultrassom

5.3.1. Seleção do solvente extrator

Para a escolha do solvente extrator foram avaliados os solventes empregados nos métodos oficiais da União Europeia e da AOAC, sendo eles, o HClO_4 e o metanol, respectivamente. Além destes, foi testado o TCA, sendo este o solvente mais comumente utilizado e o etanol por ser um solvente ambientalmente seguro, podendo ainda ser obtido de fontes renováveis (AOAC, 977.13, 2002; EU Regulation N.

1019/2013; Regulation (EC) N. 2073/2005; VIAN *et al.*, 2017; TOBISZEWSKI *et al.*, 2017). Os resultados obtidos em termos de recuperação e efeito matriz são apresentados nas Figuras 14 e 15, sendo avaliados mediante o teste de Tukey (Tabelas 13 e 14).

Figura 14: Recuperações quando avaliado diferentes solventes. Barra de erro significa valores calculados em RSD. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3 g

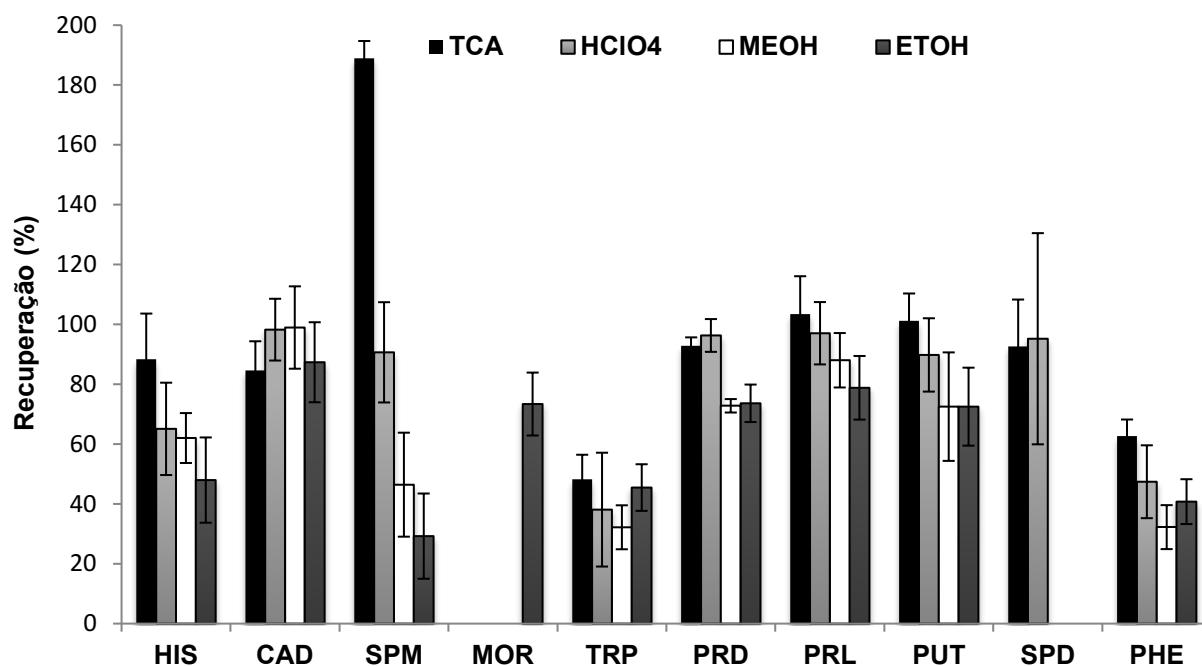


Tabela 13: Resultados do teste Tukey HSD relativo às recuperações quando testado diferentes solventes

Recuperação (%)										
Solventes	PRD	PRL	PHE	TRP	SPM	SPD	HIS	CAD	PUT	MOR
TCA	93 ^a	103 ^a	63 ^a	48 ^a	189 ^a	93 ^a	88 ^a	85 ^a	101 ^a	0
HClO ₄	96 ^a	97 ^{a, b}	47 ^b	38 ^{c, b}	91 ^b	95 ^a	65 ^b	98 ^a	90 ^{a, b}	0
MEOH	73 ^b	88 ^{b, c}	32 ^c	32 ^c	46 ^c	0	62 ^{b, c}	99 ^a	73 ^b	0
ETOH	74 ^b	79 ^c	41 ^{b, c}	45 ^a	29 ^d	0	48 ^c	87 ^a	73 ^b	73 ^a

*HSD, diferença honestamente significativa do inglês *honest significant difference*

As recuperações obtidas variaram de 0 a 99% quando empregado o metanol como solvente extrator, 0 a 87% quando utilizado o etanol, 0 a 189% para o TCA e 0 a 98% quando avaliado o uso do HClO_4 . Mediante o teste de Tukey realizado foi possível constatar que os melhores resultados em termos de recuperação foram obtidos empregando os ácidos tricloroacético e perclórico como solvente extrator. A maior acidez deles faz com que a sua capacidade de protonar as moléculas seja maior, podendo protonar as aminas e removê-las na forma de sais de amônio (ALAM *et al.*, 2017; MCKEEN, 2006).

De acordo com a Tabela 6 relativo às propriedades dos solventes empregados, os ácidos são mais viscosos que o etanol e o metanol, o que cria uma maior resistência à transferência de massa, podendo dificultar a difusão do analito para o solvente extrator. Entretanto, ainda sim, as recuperações foram superiores para os ácidos, o que evidencia que o fator dominante ocorrido na extração quando avaliado estes solventes foi a protonação das aminas (ALAM *et al.*, 2017; MCKEEN, 2006).

Para alguns compostos (PRL, SPM, HIS e CAD), o metanol apresentou maiores recuperações comparativamente ao etanol, o que pode ser atribuído à sua maior polaridade, e conseqüentemente uma maior capacidade de extração dos analitos polares. Por outro lado, o que também pode ter resultado em maiores recuperações quando empregado o metanol, é a sua menor viscosidade, o que lhe confere uma maior capacidade de permeação na amostra, favorecendo a difusão do analito e sua migração para fase orgânica. Vale ressaltar ainda que, a eficiência extrativa do ultrassom é potencializada com a redução da viscosidade do solvente. Deste modo, uma extração assistida por ultrassom empregando o metanol como solvente extrator possibilita a obtenção de maiores recuperações comparativamente ao emprego do etanol (CHEMAT *et al.*, 2017; TIWARI, 2015).

Apesar da obtenção de maiores recuperações quando empregado os ácidos perclórico e tricloroacético como solvente extrator, as recuperações obtidas para a PRD, PRL, CAD e PUT para o etanol atendem aos valores estipulados pelos órgãos reguladores (SANTE, 2017). Importa referir ainda que, provavelmente devido à reduzida solubilidade da MOR nos solventes metanol, TCA e HClO_4 , a sua extração só foi possível quando empregado o etanol como solvente extrator. Por outro lado, o TCA e o HClO_4 podem ter sofrido uma desprotonação e estabelecido uma ligação com o grupamento amino da MOR, o que dificulta a solvatação do resto da molécula, refletindo deste modo numa reduzida eficiência extrativa (CHABAN *et al.*, 2016).

Apesar de terem valores de pka bem próximos, o fato do etanol ter uma cadeia de carbono maior que o metanol pode ter favorecido a solvatação da MOR, resultando em maiores recuperações (ALAM *et al.*, 2017; MCKEEN, 2006).

A PHE e a TRP não apresentaram recuperações entre 70-120% para nenhum dos solventes empregados, e a extração da SPD só foi possível quando empregado ácidos como solvente extrator. É provável que os ácidos empregados devido à sua maior facilidade de sofrer desprotonação tenham formado um par iônico com os grupos amino, dificultando a solvatação pelos outros solventes, isso devido ao impedimento estérico (HULTGREN *et al.*, 2004).

Relativamente ao efeito matriz, este foi alto para a maioria dos compostos analisados, conforme mostra a Figura 15. Os resultados do teste de Tukey (Tabela 14) evidenciarem diferenças significativas quanto ao efeito matriz para todos compostos, entretanto, para todos os solventes empregados o efeito matriz foi alto (> 50%), mostrando a necessidade de correção do mesmo (SANTE, 2017).

Figura 15: Efeito matriz quando avaliado diferentes solventes. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3 g

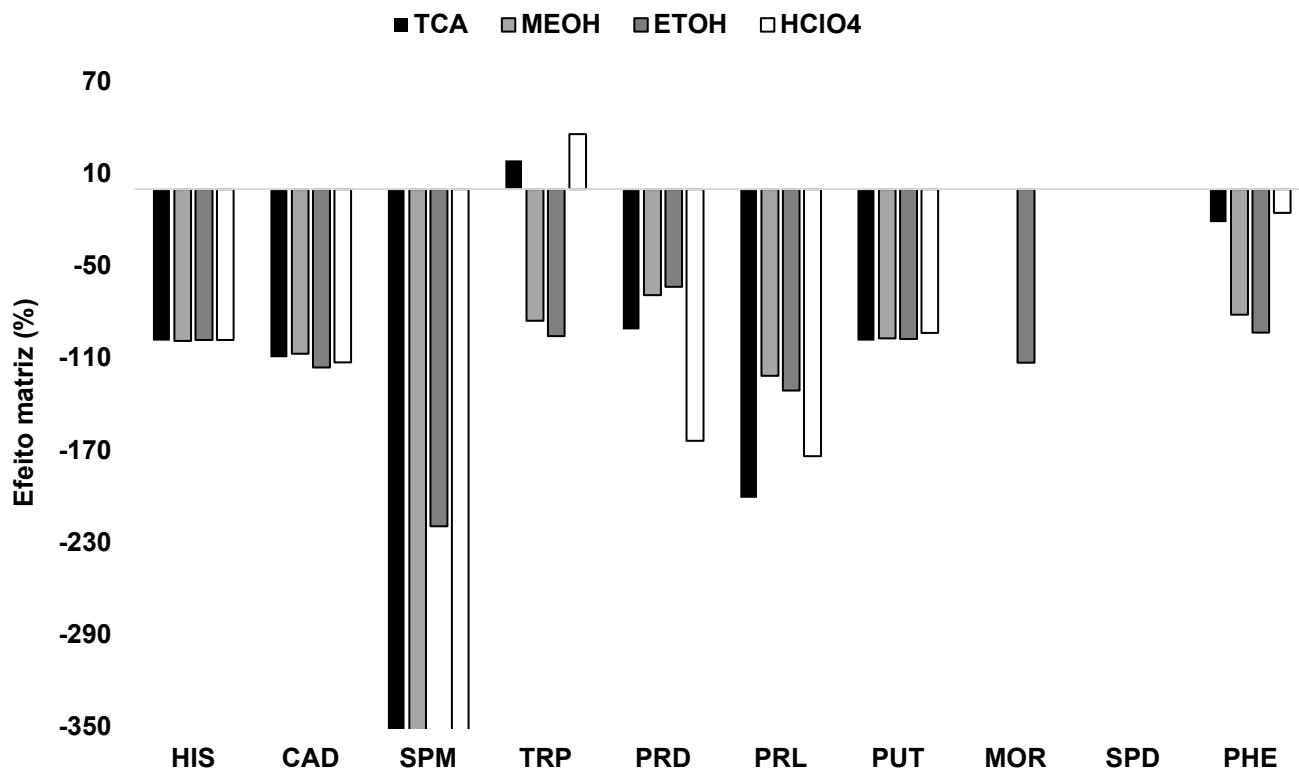


Tabela 14: Resultados do teste Tukey HSD relativo ao efeito matriz quando testado diferentes solventes

Solventes	Efeito matriz (%)								
	PRD	PRL	PHE	TRP	SPM	HIS	CAD	PUT	MOR
TCA	-91 ^b	-201 ^c	-22 ^a	19 ^a	-384 ^b	-99 ^b	-110 ^b	-99 ^b	
HClO ₄	-164 ^c	-174 ^{c,b}	-16 ^a	-36 ^b	-3216 ^c	-97 ^a	-113 ^b	-94 ^a	
MEOH	-69 ^a	-122 ^{a, b}	-82 ^b	-86 ^c	-363 ^b	-99 ^b	-107 ^a	-97 ^b	
ETOH	-64 ^a	-131 ^a	-94 ^c	-96 ^c	-220 ^a	-98 ^b	-116 ^c	-98 ^b	-113 ^a

É possível observar que para a PHE e TRP, o efeito matriz foi maior para os álcoois comparativamente aos ácidos empregados. Considerando as proteínas como interferentes, o que poderia estar na origem deste resultado seria o menor pH dos ácidos empregados que, por sua vez realizam uma desnaturação da proteína, juntamente com a sua precipitação. Por outro lado, para a PRD o efeito matriz foi maior para os ácidos comparativamente aos álcoois empregados, provavelmente devido à maior capacidade de protonação do grupamento amino, resultando numa maior extração dos co-extrativos proteicos (GROSSMANN *et al.*, 2018; MAQUEDA *et al.*, 2013).

É importante ressaltar que o efeito matriz não depende exclusivamente do número de co-extrativos, sendo a natureza química dos analitos um fator chave capaz de torná-lo passível de sofrer uma maior ou menor supressão ou enriquecimento do sinal. De acordo com CAPPIELLO *et al.*, 2010, compostos mais polares são mais afetados pela supressão de íons. CECH *et al.*, 2000 postula que existem duas fases separadas nas gotas obtidas por eletropulverização, sendo o excesso de carga produzido no processo residente na superfície da gota. A fase do interior das gotículas é neutra e consiste em moléculas do solvente, eletrólitos e dos analitos mais polares. O autor demonstrou que os compostos mais apolares residentes na superfície das gotículas têm uma resposta maior e suprimem o sinal dos compostos mais polares no interior da gota (CAPPIELLO *et al.*, 2010; CECH *et al.*, 2000; TRUFELLI, *et al.*, 2011). Também foi demonstrado que compostos com menor massa molecular são mais propensos ao efeito matriz, isso devido à produção de fragmentos com menor razão m/z, que são mais susceptíveis de

sofrer o efeito dos componentes da matriz (CAPPIELLO *et al.*, 2010; TRUFELLI, *et al.*, 2011).

Tendo em conta estes aspectos, é possível constatar pela Tabela 14 que os compostos que apresentaram as maiores porcentagens de efeito matriz foram a PRL e a SPM. A PRL por ser o composto com menor massa molecular dentre os analisados, sendo, portanto, mais susceptível a sofrer um incremento do sinal, uma vez que, o mesmo origina fragmentos de baixa razão m/z (PRL origina fragmentos de $m/z=30$), que também podem ser formados pelos interferentes presentes na matriz. Com relação à SPM, a provável explicação para a obtenção de maiores porcentagens de efeito matriz comparativamente aos outros compostos está relacionada com sua maior polaridade ($\text{Log}_{\text{KOW}} = -1,45$), o que resulta numa maior probabilidade de sofrer interferências na resposta analítica, pelos mecanismos elucidados por CECH *et al.*, 2000. É possível observar ainda pela Tabela 14 que a HIS, CAD, PUT, MOR, PRD são mais afetados pelos co-extrativos da matriz comparativamente à PHE e à TRP em todos os solventes avaliados. Provavelmente a menor massa molecular destes compostos em relação à PHE e TRP esteja na origem destes resultados (CECH *et al.*, 2000; CHATZIMITAKOS *et al.*, 2016).

Atendendo à crescente conscientização com relação aos aspectos ambientais tem-se um maior investimento no desenvolvimento e na pesquisa buscando introduzir solventes ambientalmente seguros nos procedimentos de extração a fim de reduzir a intensidade das atividades antropogênicas relacionadas aos laboratórios analíticos. Nesse sentido, tendo em conta o fato do etanol ter proporcionado recuperações entre 70 e 120% para a maioria das BAs analisadas, estando em conformidade com a SANTE, 2017, e que o efeito matriz foi alto para a maioria dos analitos independentemente do solvente extrator empregado, além da menor toxicidade do etanol comparativamente aos outros solventes empregados, o mesmo foi selecionado para os próximos testes (BRAUTBAR, 2014; HAHN, *et al.* 2014; KILBURN, 2014; PLOTKA *et al.*, 2017; VIAN *et al.*, 2017; TOBISZEWSKI *et al.*, 2017; SANTE, 2017).

Vale ressaltar que, a SPD foi removida do método uma vez que não foi possível a sua extração empregando o etanol como solvente extrator.

A quantificação correta das BAs em pescados é uma operação analítica que apresenta um acentuado grau de dificuldade, o que tem a ver sobretudo com o alto conteúdo de co-extrativos o que dificulta a sua extração livre de compostos interferentes, influenciando tanto os resultados analíticos quantitativos e qualitativos. É importante

destacar que, a supressão de íons causado pela competição entre diferentes compostos (matriz/analitos) para se ionizar a partir da superfície das gotículas, é o efeito matriz mais comum em métodos baseados em LC, especialmente quando o espectrômetro de massas opera no modo de ionização por ESI, de modo que, estratégias de redução de co-extrativos diminuem o número de moléculas concorrentes por micro gotícula, aumenta a eficiência de ionização e, assim, o sinal do analito também é aumentado (ONAL, 2007; GOMEZ *et al.*, 2016; ZANELLA *et al.*, 2017). Neste sentido, foi avaliado o efeito da acidificação do solvente extrator na remoção de interferentes, assim como o uso de materiais sorventes, o uso de solvente extrator alcalinizado, ou ainda a alcalização do solvente extrator seguido da acidificação do extrato. A seguir encontram-se os resultados obtidos para estes diferentes testes.

5.3.2. Solvente extrator acidificado

Com o intuito de reduzir a interferência das proteínas na análise das BAs por meio de sua precipitação, RICHARD *et al.*, 2011 avaliou o efeito do metanol acidificado com HCl, na redução do efeito matriz. Baseando nisso, foi avaliado neste projeto o efeito do etanol acidificado com HCl 0,1 mol L⁻¹ (75% de etanol e 25% de HCl) e etanol acidificado com TCA 5% (75% de etanol e 25% de TCA 5%) na redução de co-extrativos. A Figura 16 apresenta os resultados obtidos e a Tabela 15 o teste de diferença significativa com relação a estes resultados.

As recuperações variaram de 32 a 97% quando avaliado o uso etanol acidificado com HCl 0,1 mol L⁻¹ como solvente extrator e de 38 a 141% quando avaliado o uso de etanol acidificado com TCA 5%. Foi possível observar também que houve um ligeiro aumento nas recuperações quando empregado solvente extrator acidificado. Isso pode ter acontecido devido à maior capacidade de protonação dos solventes acidificados, extraindo as aminas na forma de sais de amônio (ALAM *et al.*, 2017; MCKEEN, 2006).

Figura 16: Recuperações quando avaliado o solvente acidificado com HCl 0,1 mol L⁻¹ e TCA 5%. Barra de erro significa valores calculados em RSD. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3 g

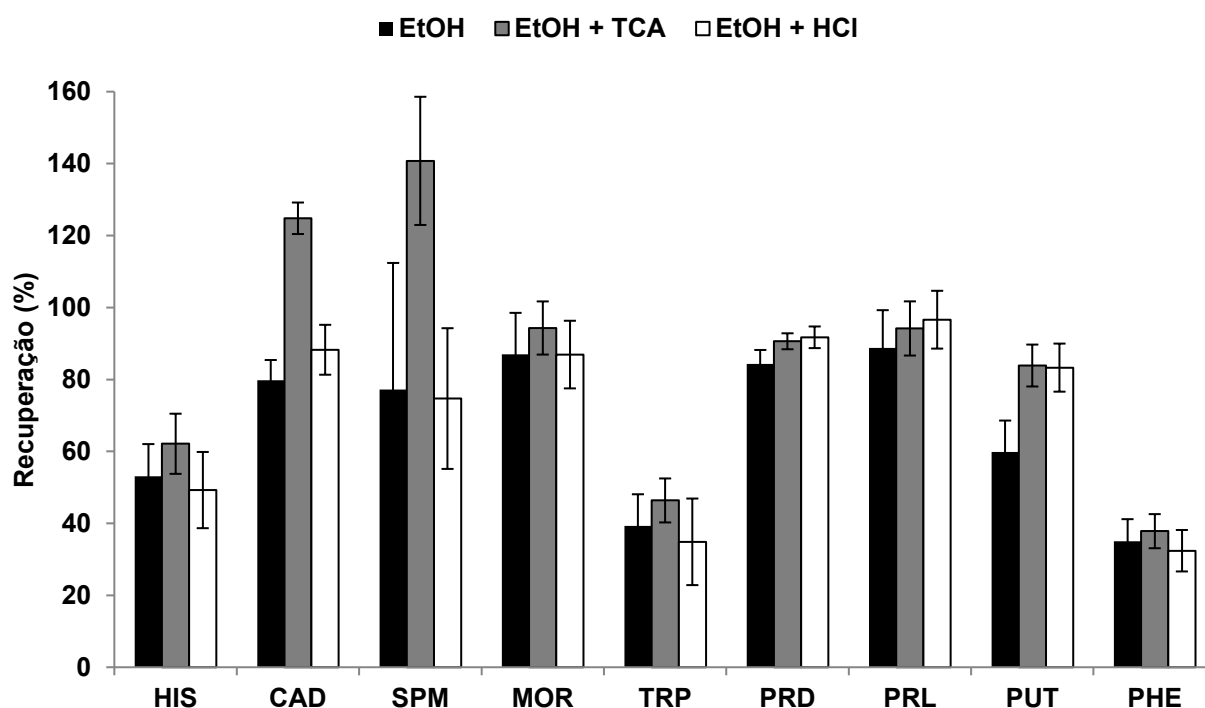


Tabela 15: Resultados do teste Tukey HSD relativo às recuperações quando testado etanol acidificado com TCA 5% e HCl 0,1 mol L⁻¹

Recuperações (%)									
Solventes	PRD	PRL	PHE	TRP	SPM	HIS	CAD	PUT	MOR
ETOH + TCA	91 ^a	94 ^a	38 ^a	46 ^a	141 ^a	62 ^a	125 ^a	84 ^a	94 ^a
ETOH + HCl	92 ^a	97 ^a	32 ^b	35 ^b	89 ^b	49 ^b	88 ^b	83 ^a	87 ^a
ETOH	84 ^b	89 ^a	35 ^{a, b}	39 ^b	66 ^b	53 ^b	80 ^b	60 ^b	87 ^a

De acordo com o teste de Tukey não houve diferença significativa apenas para a PRL e MOR quando avaliado o uso do solvente extrator acidificado e não acidificado. Com relação à PHE, TRP e HIS não obteve-se recuperações dentro dos limites preconizados pelas agências reguladoras para nenhuma das condições avaliadas (SANTE, 2017).

Relativamente ao efeito matriz (Figura 17), de acordo com os resultados do teste de Tukey (Tabela 16), não existe diferença significativa apenas para a HIS mediante os diferentes solventes empregados. Os demais compostos apresentaram diferença significativa, sendo que, o emprego de solvente extrator acidificado proporcionou uma ligeira diminuição da interferência de co-extrativos para PRL, TRP, MOR e PHE, sugerindo uma possível redução de co-extrativos proteicos mediante a utilização de solvente extrator acidificado, porém, os valores de efeito matriz ainda são altos (RICHARD *et al.*, 2011; SANTE, 2017).

Figura 17: Efeito matriz quando avaliado solvente extrator acidificado com HCl 0,1 mol L⁻¹ e TCA 5%. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3 g

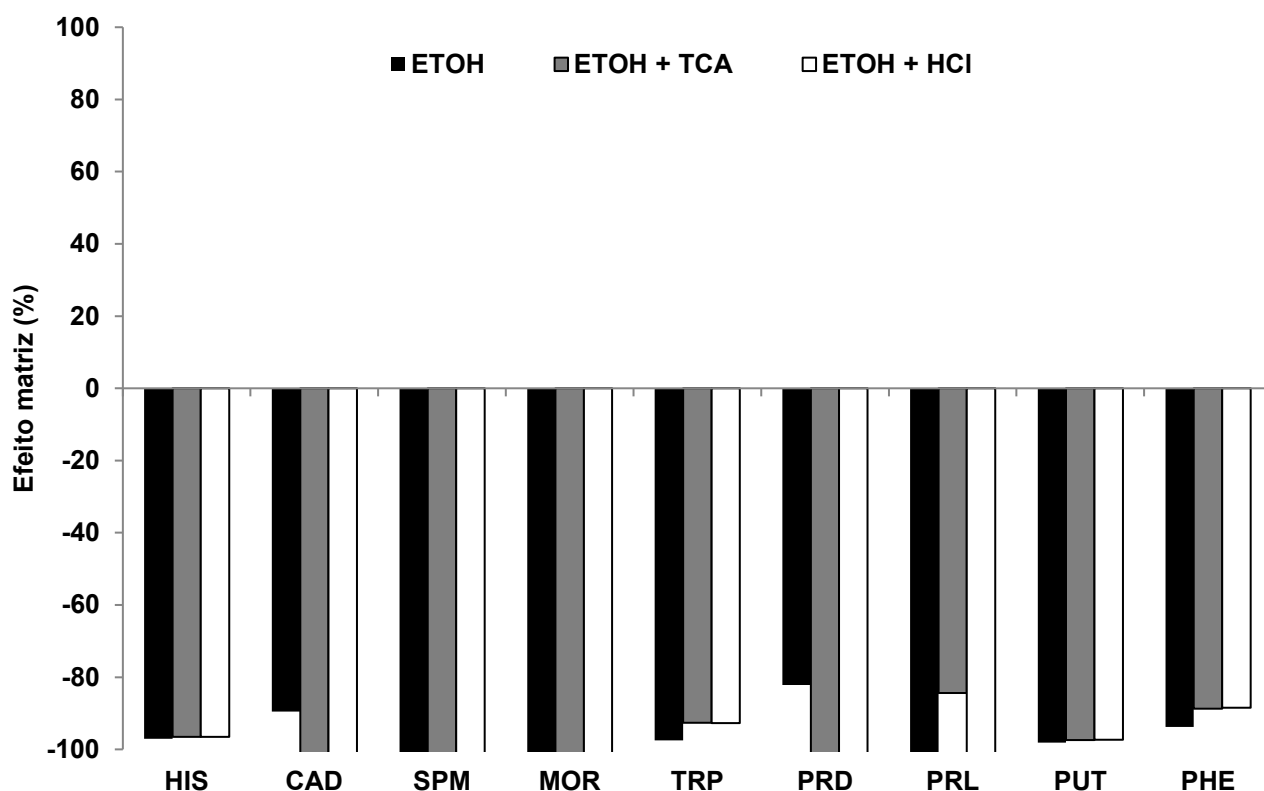


Tabela 16: Resultados do teste Tukey HSD relativo ao efeito matriz quando testado etanol acidificado com TCA 5% e HCl 0,1 mol L⁻¹

Solventes	Efeito matriz (%)								
	PRD	PRL	PHE	TRP	SPM	HIS	CAD	PUT	MOR
ETOH + TCA	-111 ^b	-84 ^a	-89 ^a	-93 ^a	-109 ^b	-97 ^a	-136 ^b	-97 ^a	-108 ^b
ETOH + HCl	-123 ^b	-114 ^b	-88 ^a	-93 ^a	-105 ^a	-97 ^a	-102 ^b	-97 ^a	-106 ^a
ETOH	-82 ^a	-186 ^c	-94 ^b	-98 ^b	-105 ^a	-97 ^a	-90 ^a	-98 ^b	-121 ^c

É possível observar um aumento no efeito matriz para a CAD e a PRD quando se emprega solvente extrator acidificado. A maior capacidade de protonação dos solventes acidificados tem como vantagem a possibilidade de aumento das recuperações, removendo as aminas na forma de sais de amônio, entretanto, além das BAs, os co-extrativos da matriz como aminoácidos, peptídeos e proteínas também podem ser protonados e extraídos, resultando assim, no incremento do efeito matriz (ALAM *et al.*, 2017; MCKEEN, 2006).

Apesar de se ter observado uma diminuição do efeito matriz para alguns compostos, todas as BAs analisadas ainda possuem um efeito matriz alto. Deste modo, considerando que a utilização do solvente extrator acidificado não foi eficiente na redução do efeito matriz até os limites preconizados pela órgãos reguladores, foi selecionado o etanol puro como solvente extrator. Uma outra estratégia foi implementada com o intuito de reduzir o número de co-extrativos, sendo o emprego da USLE seguida de uma etapa de limpeza por d-SPE, utilizando materiais sorventes clássicos e alternativos, que atuam como um filtro químico, efetuando a limpeza do extrato antes da análise cromatográfica.

5.3.3. Avaliação do efeito do sorvente na redução do efeito de matriz

Foram avaliados sorventes clássicos como C18, PSA e alumina e os sorventes alternativos quitina, quitosana, areia de Bojuru e concha de mexilhão dourado. Estes sorventes foram selecionados mediante relatos na literatura evidenciando sua capacidade de remoção de diversos compostos. Essa remoção de interferentes diminui o número de moléculas concorrentes por micro gotícula, a eficiência de ionização

aumenta e, assim, o sinal do analito também é aumentado (ARIAS *et al.*, 2014; DOTTO *et al.*, 2017; GOMEZ *et al.*, 2016; KOMI *et al.*, 2016; PENG *et al.*, 2016; ROMBALDI *et al.*, 2015; TRUFELLI *et al.*, 2011).

Foram avaliadas a exatidão em termos de recuperação, desvio padrão relativo (RSD) e efeito matriz para todos os sorventes em estudo e sem o uso de sorventes. As extrações apresentaram recuperações entre 15 e 108%, conforme ilustrado na Figura 18 e valores de RSD inferiores a 22%.

Figura 18: Recuperações quando testado diferentes sorventes. Barra de erro significa valores calculados em RSD. O volume de solvente foi de 5 mL e a quantidade de sorvente foi de 150 mg

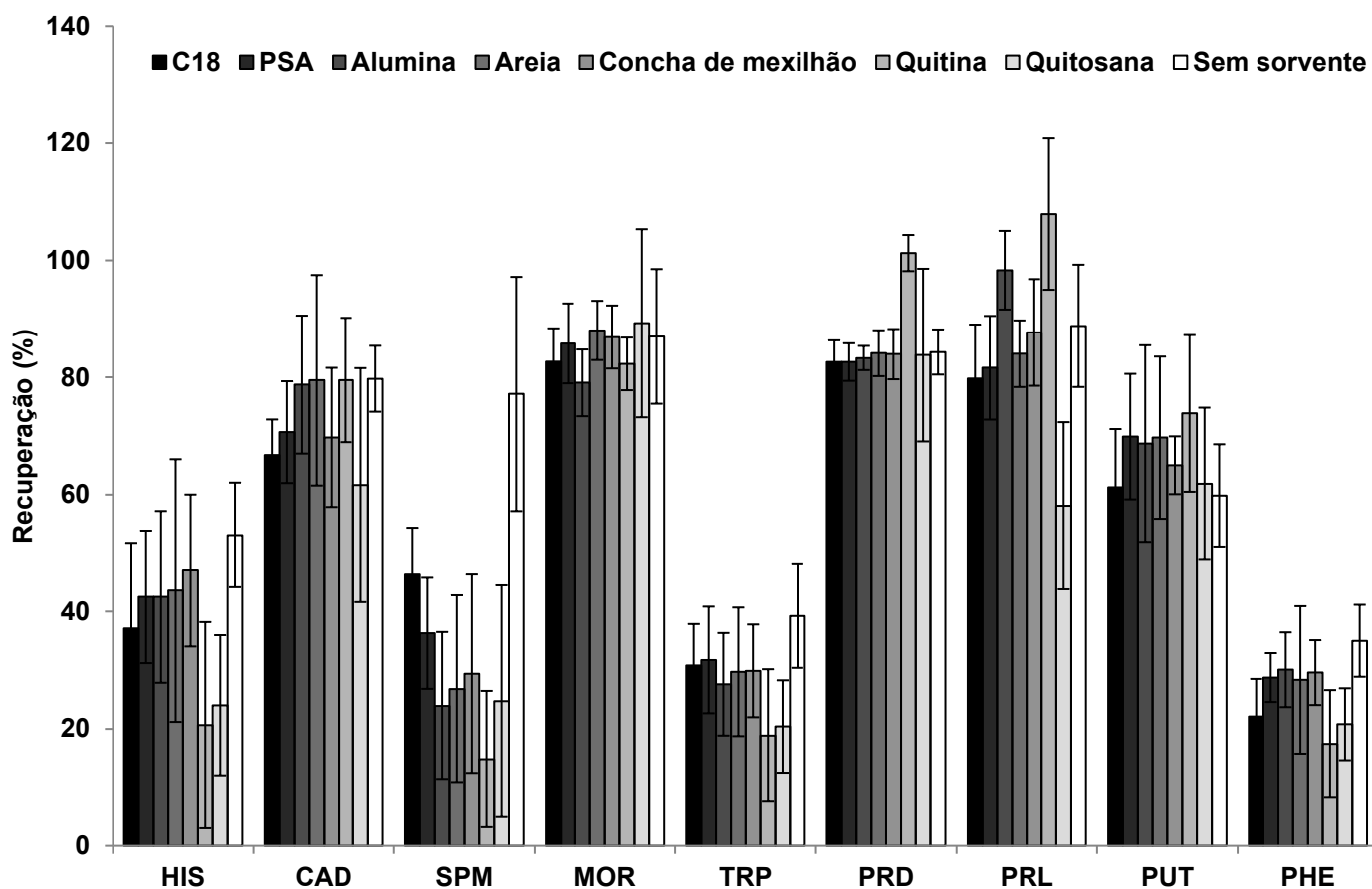


Tabela 17: Resultados do teste Tukey HSD relativo às recuperações quando testado diferentes sorventes e sem o uso de sorvente

Sorvente	Recuperações (%)								
	HIS	CAD	SPM	MOR	TRP	PRD	PRL	PUT	PHE
C18	37 ^b	67 ^a	46 ^{a, b}	83 ^a	31 ^b	83 ^b	80 ^{a, b}	61 ^a	22 ^c
PSA	43 ^{a, b}	71 ^a	36 ^{b, c}	86 ^a	32 ^b	83 ^b	82 ^{a, b}	70 ^a	29 ^b
Alumina	43 ^b	79 ^a	24 ^{b, c}	79 ^a	28 ^b	83 ^b	98 ^a	69 ^a	30 ^{a, b}
Areia	44 ^{a, b}	80 ^a	27 ^{b, c}	88 ^a	30 ^b	84 ^b	84 ^{a, b}	70 ^a	28 ^b
Concha	47 ^{a, b}	70 ^a	29 ^{b, c}	87 ^a	30 ^b	84 ^b	88 ^a	65 ^a	30 ^{a, b}
Quitina	21 ^c	80 ^a	15 ^c	82 ^a	19 ^c	101 ^a	108 ^a	74 ^a	17 ^c
Quitosana	24 ^c	62 ^a	25 ^{b, c}	89 ^a	20 ^c	84 ^b	58 ^b	62 ^a	21 ^c
Sem sorvente	53 ^a	80 ^a	77 ^a	87 ^a	39 ^a	84 ^b	89 ^a	60 ^a	35 ^a

Para a areia, os resultados em termos de recuperação variaram de 27 a 88% para todos os analitos, havendo uma diminuição nas recuperações da HIS, SPM, TRP e PHE. A análise feita por EDX evidenciou a presença de dióxido de titânio (TiO₂) na areia utilizada como sorvente. A presença deste composto e a possibilidade de interações ácido-base ou ainda interações por troca do ligante podem ter resultado na redução das recuperações quando empregada a areia como sorvente (XU *et al.*, 2016).

Empregando a alumina como sorvente obteve-se recuperações entre 24 e 98%, tendo havido uma redução das recuperações da HIS, SPM, TRP, MOR e PHE. O fato do Al (III) e aminas serem ácidos rígidos e bases rígidas, respectivamente, e a possibilidade de interação entre os mesmos pode ter conduzido a uma redução nas recuperações, isso de acordo com a teoria dos ácidos e bases duros e moles (HSAB, do inglês *hard soft acid base*) (XU *et al.*, 2016).

HIS, PHE, TRP e SPM tiveram uma diminuição nas recuperações quando empregada a quitina e quitosana como sorvente comparativamente à condição na

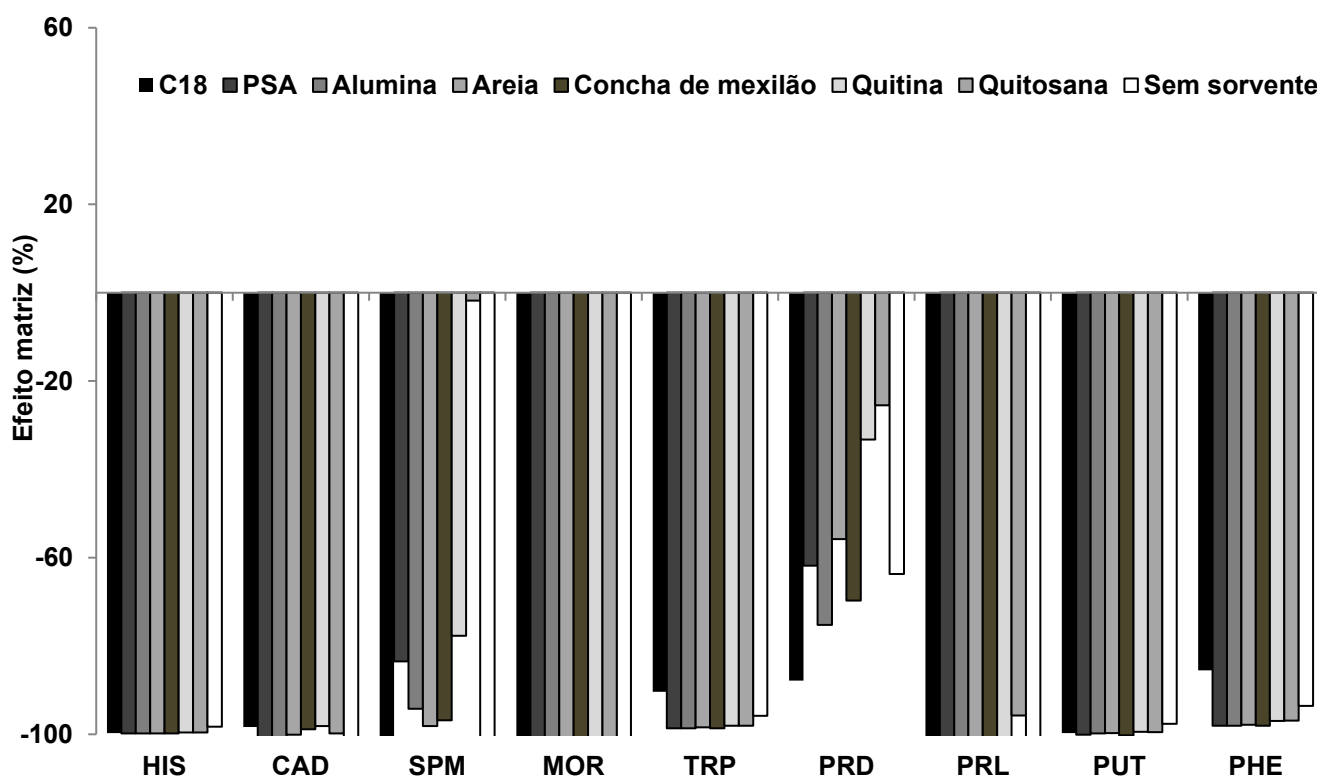


Tabela 18: Resultados do teste Tukey HSD relativo ao efeito matriz quando testado diferentes sorventes e sem o uso de sorvente

Sorvente	Efeito matriz (%)								
	HIS	CAD	SPM	MOR	TRP	PRD	PRL	PUT	PHE
C18	-100 ^b	-98 ^a	-111 ^b	-131 ^c	-90 ^a	-88 ^d	-133 ^b	-100 ^b	-86 ^a
PSA	-100 ^b	-101 ^b	-83 ^b	-127 ^b	-99 ^{c, d}	-62 ^c	-138 ^b	-100 ^b	-98 ^c
Alumina	-100 ^b	-101 ^b	-94 ^b	-129 ^b	-99 ^d	-75 ^d	-152 ^b	-100 ^b	-98 ^c
Areia	-100 ^b	-100 ^b	-98 ^b	-141 ^{c, d}	-98 ^{c, d}	-56 ^c	-124 ^b	-100 ^b	-98 ^c
Concha	-100 ^b	-99 ^a	-97 ^b	-136 ^c	-99 ^d	-70 ^{d, c}	-135 ^b	-100 ^b	-98 ^c
Quitina	-100 ^b	-98 ^a	-78 ^b	-120 ^b	-98 ^c	-33 ^{b, a}	-152 ^b	-99 ^{a, b}	-97 ^c
Quitosana	-100 ^b	-100 ^b	-2 ^a	-127 ^b	-98 ^c	-25 ^a	-96 ^a	-99 ^{a, b}	-97 ^c
Sem sorvente	-98 ^{a, b}	-116 ^c	-220 ^c	-113 ^a	-96 ^b	-64 ^c	-131 ^b	-98 ^a	-94 ^b

A quitosana promoveu uma redução do efeito matriz apenas para a SPM (de -220 para -2%) e PRD (de 64 para 25%) em relação à ausência de sorvente. Para a SPM o efeito matriz não é considerado significativo (abaixo de 20%) com a utilização da quitosana e com relação à PRD o efeito matriz foi médio. As ligações iônicas que a quitosana pode estabelecer são fortemente influenciadas pelo pH do meio reacional, influenciando também na capacidade de adsorção de interferentes. Portanto a quitosana pode não ter sido efetiva na redução de co-extrativos pelo fato de o meio na qual foi empregada não estar ácido, não ocorrendo deste modo a formação um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino (NH_3^+), o que dificulta a sua interação eletrostática com os interferentes (DONG *et al.*, 2017; SANTE, 2017).

De acordo com a teoria dos ácidos e bases duros e moles (HSAB), sendo o Al (III) e aminoácidos ácidos rígidos e bases duros, respectivamente e o fato dos aminoácidos serem espécies ricas em elétrons que podem quelar com Al, da alumina, era esperado

um decréscimo no efeito matriz, resultante da interação dos aminoácidos com a Al, no entanto, obte-se um incremento do efeito matriz quando avaliado o efeito da alumina na remoção de interferentes (XU *et al.*, 2016).

Os outros sorventes empregados também não foram eficientes na redução do efeito matriz, tendo os resultados do teste de Tukey evidenciado diferenças significativas entre o não uso de sorvente e o emprego do mesmo para todos os compostos analisados (Tabela 18).

A PRD teve uma redução na interferência de co-extrativos, passando de efeito matriz alto para médio quando avaliado o uso da quitina e da quitosana e mexilhão e quitina). Estes sorventes atuam na remoção de uma vasta gama de compostos, dentre eles, co-extrativos lipofílicos, moléculas aromáticas, além de outros compostos polares. É provável que estes sejam os compostos responsáveis pelo alto efeito de matriz da PRD, tendo sido removidos mediante o uso de materiais sorventes que atuam como filtro químico. Houve um decréscimo na percentagem de efeito matriz de -64% para -25 e -33%, empregando a quitosana e a quitina, respectivamente. (ARIAS *et al.*, 2014; CABRERA *et al.*, 2012; CERQUEIRA *et al.*, 2014; SANTE, 2017;).

Apesar de ter havido a redução do efeito matriz para a PRD e SPM empregando a quitosana e a quitina, os restantes compostos apresentam efeito matriz alto, o que não justifica o emprego de uma etapa adicional de limpeza. Sendo assim, foi selecionado o método sem a etapa de limpeza, o que representa uma vantagem não só em termos de aspetos económicos, mas também pela redução do tempo de preparo de amostra, entretanto o estudo do efeito matriz indicou a necessidade da correção do mesmo. Deste modo, outras estratégias foram implementadas para a remoção de co-extrativos.

5.3.4. Avaliação do pH

Foi avaliado nesta etapa o efeito de solventes em diferentes valores de pH na redução do efeito matriz e na eficiência extrativa das BAs. Foram testados pH de 2, 4, 8, 12 e o pH do solvente (intervalo de pH entre 6 e 7) e os resultados em termos de recuperação e efeito matriz constam nas Figura 20 e 23.

O teste resultou em recuperações entre 40-147% quando empregado solvente extrator acidificado a pH 2, 42 a 122% para pH 4, 50 a 110% para pH 8, 64 a 121% para pH 12 e quando não foi realizado alterações no pH do solvente as recuperações variam de 42 a 214%.

Houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 19) em termos de recuperação nas diferentes condições avaliadas, tendo-se obtido os melhores resultados a pH 12. De acordo com DONG *et al.*, 2017, as BAs por serem bases orgânicas, podem apresentar-se como íons em condições neutras e ácidas. Um aumento do valor do pH da solução de extração até pH 12 mantém as BAs na forma molecular, tornando-os deste modo, mais fáceis de se distribuir na fase orgânica, ocasionando a obtenção de maiores recuperações (DONG *et al.*, 2017).

Figura 20: Recuperações quando avaliado o efeito do pH. Barra de erro significa valores calculados em RSD. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3 g

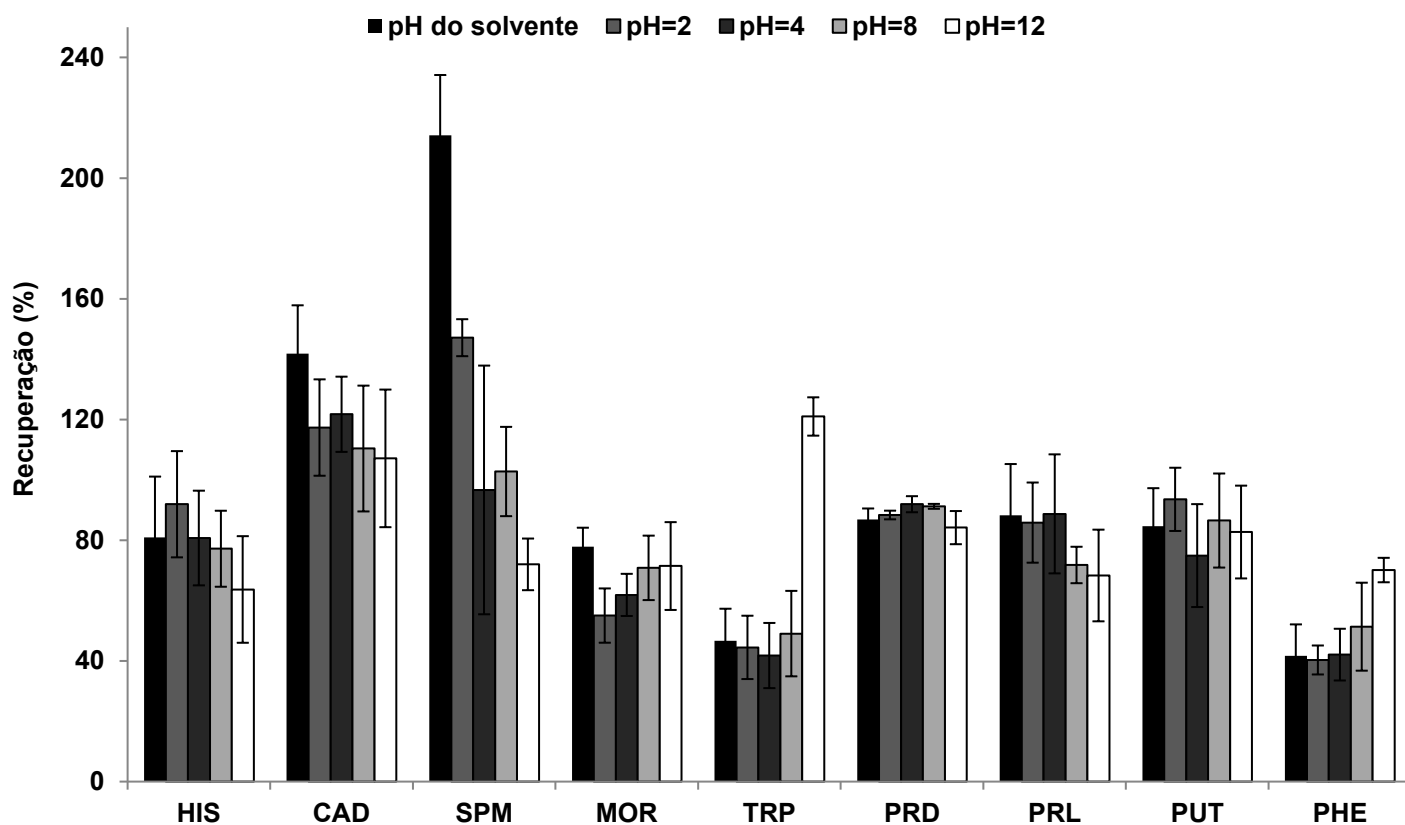


Tabela 19: Resultados do teste Tukey HSD relativo às recuperações quando testado solvente extrator a diferentes valores de pH

pH	Recuperações (%)								
	HIS	CAD	SPM	MOR	TRP	PRD	PRL	PUT	PHE
pH do solvente	81 ^{a, b}	142 ^a	214 ^a	78 ^a	47 ^b	87 ^{a, b}	88 ^a	85 ^{a, b}	42 ^{b, c}
pH 2	92 ^a	117 ^{a, b}	147 ^b	55 ^d	44 ^b	88 ^{a, b}	86 ^a	94 ^a	40 ^c
pH 4	81 ^{a, b}	122 ^{a, b}	97 ^c	71 ^{a, b}	42 ^b	92 ^a	88 ^a	75 ^b	42 ^{b, c}
pH 8	77 ^{a, b}	110 ^{a, b}	106 ^{b, c}	62 ^c	50 ^b	91 ^a	72 ^b	87 ^{a, b}	51 ^b
pH 12	64 ^b	107 ^b	72 ^c	71 ^{a, b}	121 ^a	84 ^b	68 ^b	83 ^{a, b}	70 ^a

Houve um ligeiro decréscimo da recuperação da HIS, porém a obtenção de recuperação dentro da faixa recomendada pelos órgãos regulamentadores para as aminos PHE e TRP só foi possível quando empregado solvente extrator a pH 12, provavelmente devido à presença destes compostos na sua forma molecular (Figuras 21 e 22), facilitando deste modo, a sua extração (DONG *et al.*, 2017).

Figura 21: Distribuição das espécies de PHE vs pH
(<https://chemicalize.com/#/calculation>)

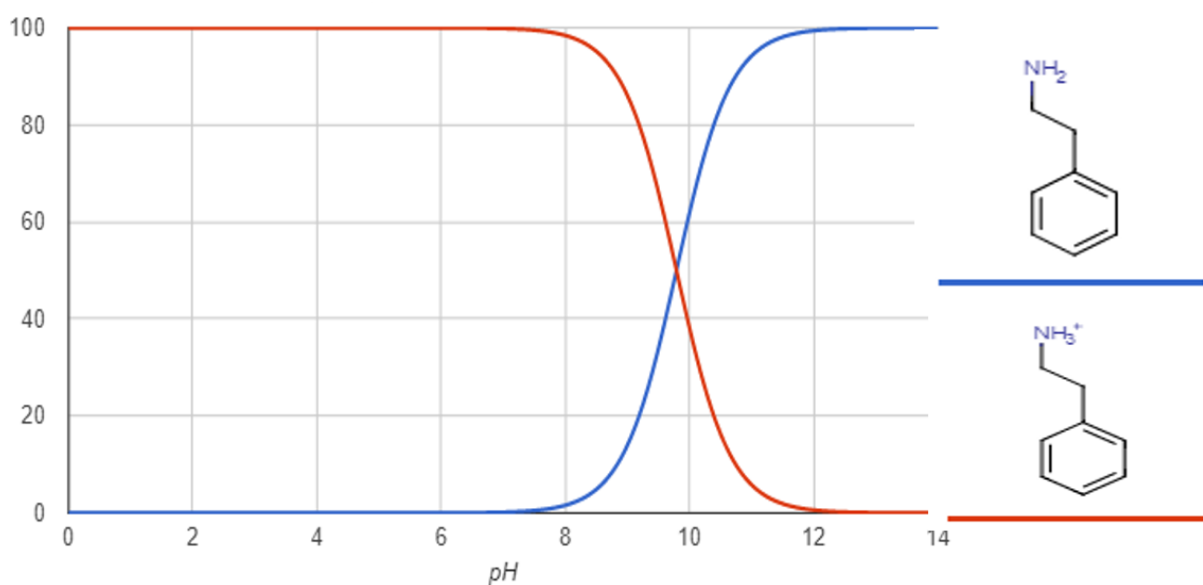
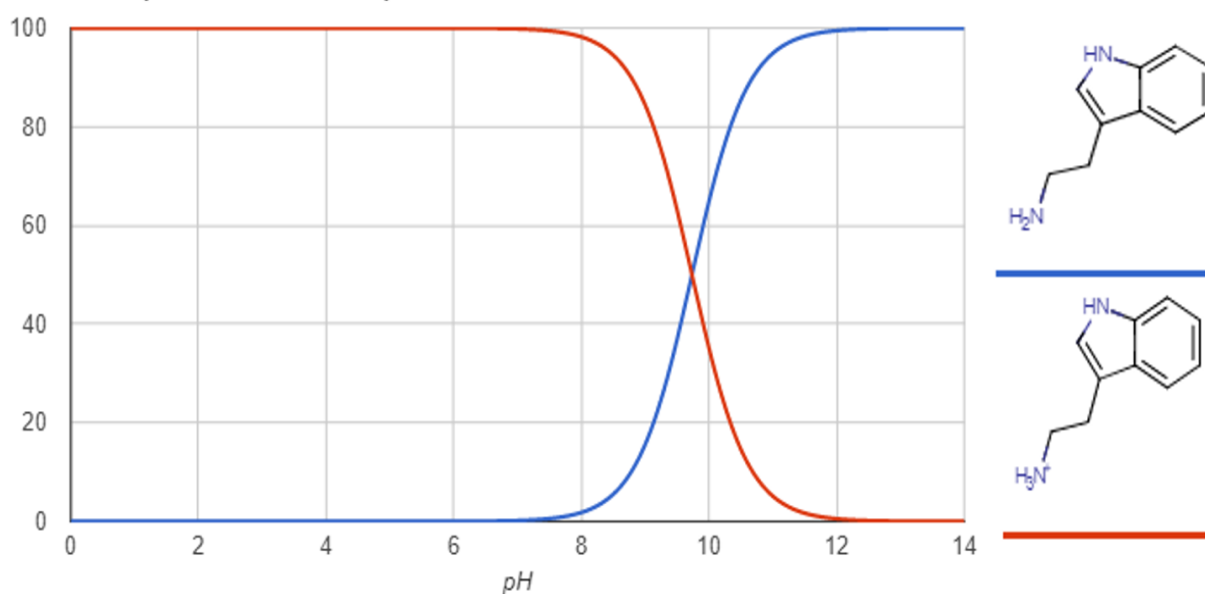


Figura 22: Distribuição das espécies de TRP vs pH
(<https://chemicalize.com/#/calculation>)



Com relação ao efeito matriz os resultados os obtidos encontram-se na Figura 23, tendo o teste de Tukey (Tabela 20) evidenciado a existência de diferença significativa entre as diferentes condições avaliadas.

Figura 23: Efeito matriz quando avaliado o efeito do pH. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3 g

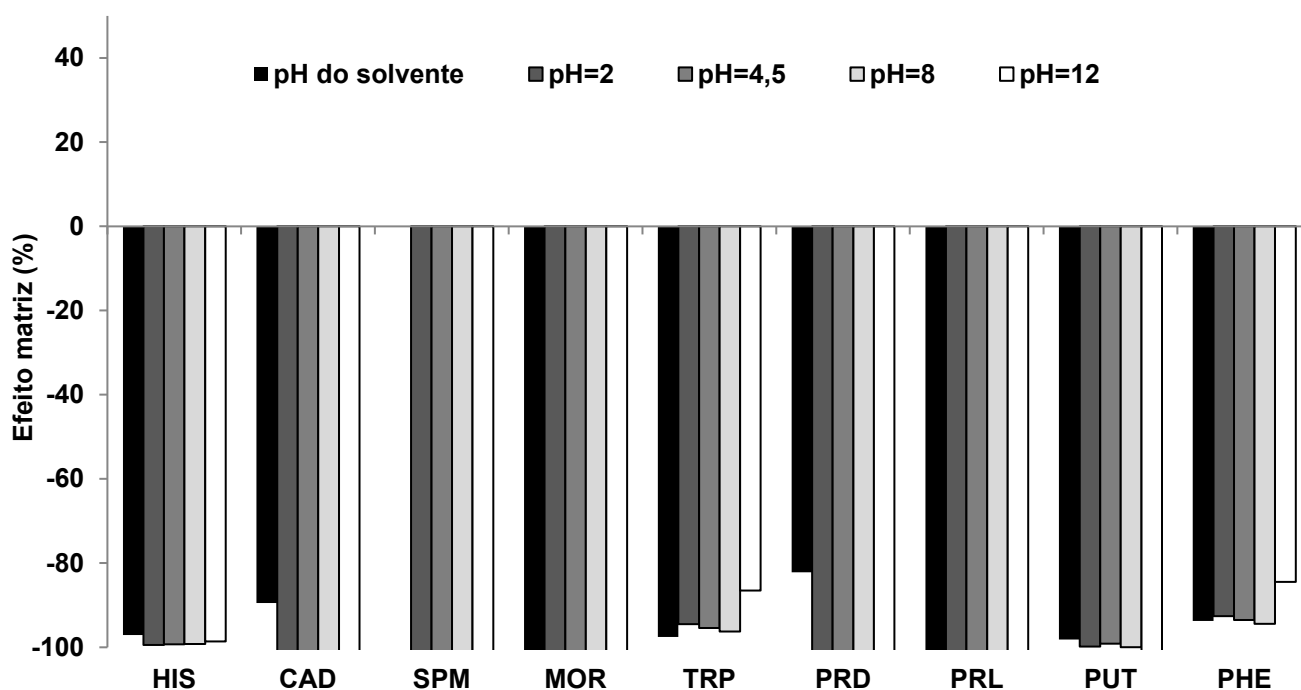


Tabela 20: Resultados do teste Tukey HSD relativo ao efeito matriz quando avaliado solvente extrator a diferentes valores de pH

pH	Efeito matriz (%)								
	HIS	CAD	SPM	MOR	TRP	PRD	PRL	PUT	PHE
pH do solvente	-97 ^a	-90 ^a	-220 ^c	-121 ^b	-98 ^d	-82 ^a	-186 ^c	-98 ^a	-94 ^c
pH 2	-99 ^{a, b}	-106 ^b	-105 ^{a, b}	-142 ^{a, b}	-95 ^b	-344 ^b	-262 ^d	-100 ^c	-93 ^{b, c}
pH 4	-99 ^{a, b}	-121 ^b	-103 ^a	-162 ^b	-95 ^{b, c}	-354 ^b	-125 ^a	-99 ^{a, b}	-93 ^{b, c}
pH 8	-99 ^c	-120 ^b	-119 ^{b, c}	-95 ^a	-96 ^{c, d}	-340 ^b	-134 ^b	-100 ^c	-94 ^c
pH 12	-174 ^c	-174 ^a	-114 ^b	-156 ^b	-87 ^a	-378 ^a	-228 ^e	-101 ^c	-84 ^a

O efeito matriz continua sendo alto (> 50%) para todas as BAs em todas as condições avaliadas, indicando a necessidade de novas estratégias para a redução dos co-extrativos. Da mesma forma que nas condições avaliadas anteriormente, a PRD e a PRL continuam sendo os compostos mais afetados pelos interferentes da matriz, provavelmente pelos mecanismos mencionados por CECH *et al.*, 2000 (CECH *et al.*, 2000; SANTE, 2017).

Houve um incremento do efeito matriz da PRD e PRL comparativamente à não modificação do pH do solvente. É provável que, a utilização de solvente extrator alcalinizado tenha mantidos os co-extrativos proteicos (aminoácidos, proteínas e peptídeos) na forma molecular, tornando-os deste modo, mais fáceis de se distribuir na fase orgânica, resultando num aumento do efeito matriz. Por outro lado, considerando o emprego do solvente extrator acidificado, a maior eficiência de protonação dos grupamentos amino dos co-extrativos proteicos, e sua remoção na forma de sais de amônio, pode estar na origem do incremento do efeito matriz (DONG *et al.*, 2017; RICHARD *et al.*, 2011).

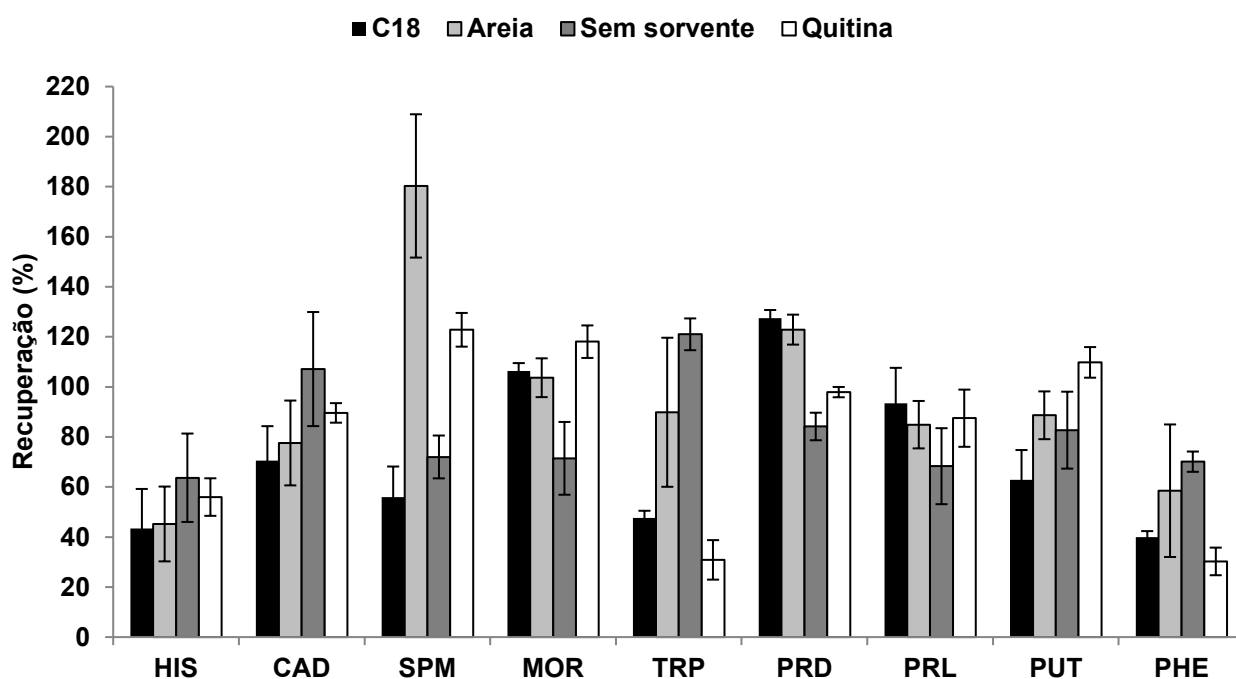
Tendo em conta que os melhores resultados em termos de recuperação foram obtidos empregando solvente extrator a pH 12, e que, o efeito matriz foi alto independentemente do pH do solvente, foi selecionado solvente extrator a pH 12 para os próximos testes.

5.3.5. Avaliação do efeito do sorvente em pH 12

Os melhores resultados em termos de recuperação (entre 70 e 120%) foram obtidos empregando solvente alcalinizado a pH 12. Entretanto, apesar da obtenção de melhores resultados, ainda há a necessidade redução da quantidade de co-extrativos. Neste sentido avaliou-se a ação conjunta do solvente extrator a pH 12 e alguns sorventes na limpeza do extrato antes da análise cromatográfica (SANTE, 2017).

Os resultados em termos de recuperação variaram de 30 a 123%, 45 a 180% e 40 a 127% quando avaliado o efeito da sinergia do solvente extrator e a capacidade de remoção de co-extrativos da quitina, areia e C18, respectivamente (Figura 24).

Figura 24: Recuperações quando testado o efeito dos sorventes em pH alcalino. Barra de erro significa valores calculados em RSD O volume de solvente foi de 5 mL e quantidade de sorvente de 150 mg



A HIS, CAD, TRP e PHE tiveram uma redução na recuperação para todos os sorventes empregados, comparativamente à condição sem sorvente. A capacidade do C18 reter compostos aromáticos, a presença do TiO_2 na areia e sua provável interação com os analitos ou ainda uma absorção irreversível das aminas pela quitina pode ter inferido nos resultados (CERQUEIRA *et al.*, 2014; DONG *et al.*, 2017; PENG *et al.*, 2016;

XU *et al.*, 2016). Por outro lado, houve um aumento nas recuperações da MOR, PRD, PRL e PUT.

Os resultados com relação ao teste de Tukey (Tabela 21) evidenciaram diferenças estatisticamente significativas para todas as BAs analisadas nas diferentes condições avaliadas, tendo-se obtido os melhores resultados em termos de recuperação (70-120%) quando não se recorre ao uso de sorventes.

Tabela 21: Resultados do teste Tukey HSD relativo às recuperações quando avaliado o efeito dos sorventes em pH alcalino

Sorventes	Recuperações (%)								
	HIS	CAD	SPM	MOR	TRP	PRD	PRL	PUT	PHE
C18	43 ^b	71 ^c	56 ^d	106 ^{a, b}	48 ^c	127 ^a	93 ^a	63 ^c	40 ^c
Areia	45 ^b	78 ^c	180 ^a	103 ^b	90 ^b	123 ^a	85 ^a	89 ^b	58 ^b
Quitina	56 ^a	90 ^b	123 ^b	118 ^a	31 ^c	98 ^b	87 ^a	110 ^a	30 ^d
Sem sorvente	64 ^a	107 ^a	72 ^c	71 ^c	121 ^a	84 ^b	68 ^b	83 ^b	70 ^a

A Figura 25 apresenta os resultados obtidos na avaliação do efeito matriz, e a Tabela 22, o teste de diferença significativa relativo a estes resultados.

Figura 25: Efeito matriz quando testado o efeito dos sorventes em pH alcalino. O volume de solvente foi de 5 mL e a quantidade de sorvente de 150 mg

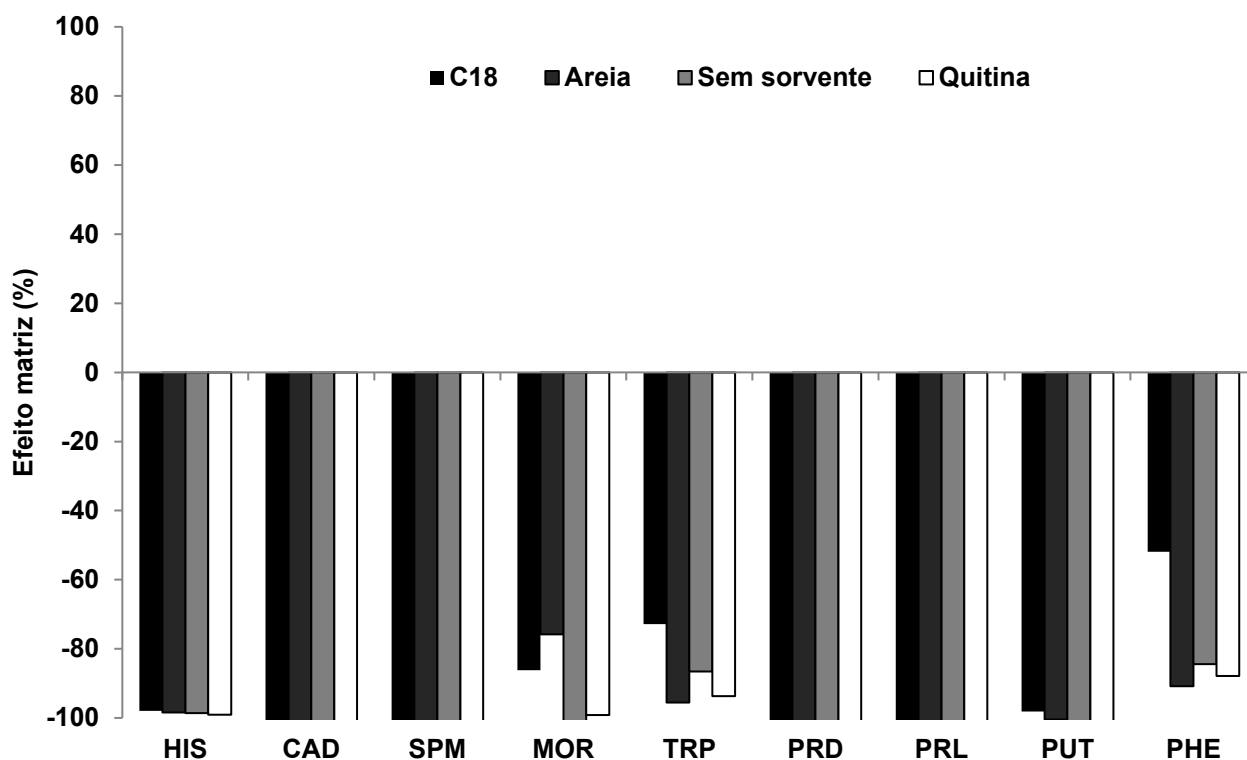


Tabela 22: Resultados do teste Tukey HSD relativo ao efeito matriz quando avaliado o efeito dos sorventes em pH alcalino

Efeito matriz (%)									
Sorvente	HIS	CAD	SPM	MOR	TRP	PRD	PRL	PUT	PHE
C18	-98 ^a	-111 ^a	-103 ^a	-86 ^b	-73 ^a	-272 ^a	-148 ^c	-98 ^a	-52 ^a
Areia	-98 ^a	-130 ^b	-105 ^b	-76 ^a	-96 ^c	-305 ^b	-115 ^b	-100 ^{c,b}	-91 ^c
Quitina	-99 ^b	-131 ^b	-105 ^b	-99 ^c	-94 ^c	-356 ^c	-106 ^a	-102 ^b	-88 ^b
Sem sorvente	-99 ^b	-174 ^c	-114 ^c	-156 ^d	-87 ^b	-378 ^d	-228 ^d	-101 ^b	-84 ^b

Apesar do teste de Tukey (Tabela 22) mostrar que existem diferenças estatisticamente significativas para todos os analitos nas diferentes condições avaliadas, o efeito matriz continua alto (> 50%) para todas as BAs analisadas independentemente do emprego ou não da etapa adicional de remoção de interferentes, indicando a necessidade de outros procedimentos de remoção de co-extrativos (SANTE, 2017).

Com a finalidade de reduzir a interferência tanto das proteínas quando dos aminoácidos, foi realizado um teste empregando um solvente extrator alcalino, seguido da acidificação do extrato.

5.3.6. Efeito do solvente a pH 12 seguido da acidificação do extrato

Atendendo ao fato dos aminoácidos não se apresentarem na sua forma iônica em pH básico, o que limita a sua interferência na análise, foi avaliado neste procedimento um solvente extrator a pH 12 para promover a sua precipitação, seguida acidificação do extrato com HCl 0,1 mol L⁻¹ a pH 4,5, promovendo deste modo, também a precipitação das proteínas (GROSSMANN *et al.*, 2018; MAQUEDA *et al.*, 2013; RICHARD *et al.*, 2011). Os resultados em termos de recuperação quando se efetua a alcalinização seguido da acidificação comparativamente ao uso apenas do solvente a pH 12 encontram-se na Figura 26, e os resultados da diferença significativa relativo a estas condições avaliadas na Tabela 23.

Figura 26: Recuperações quando testado solvente extrator alcalino seguido da acidificação do extrato. O volume de solvente foi de 5 mL e a massa de amostra de 3g

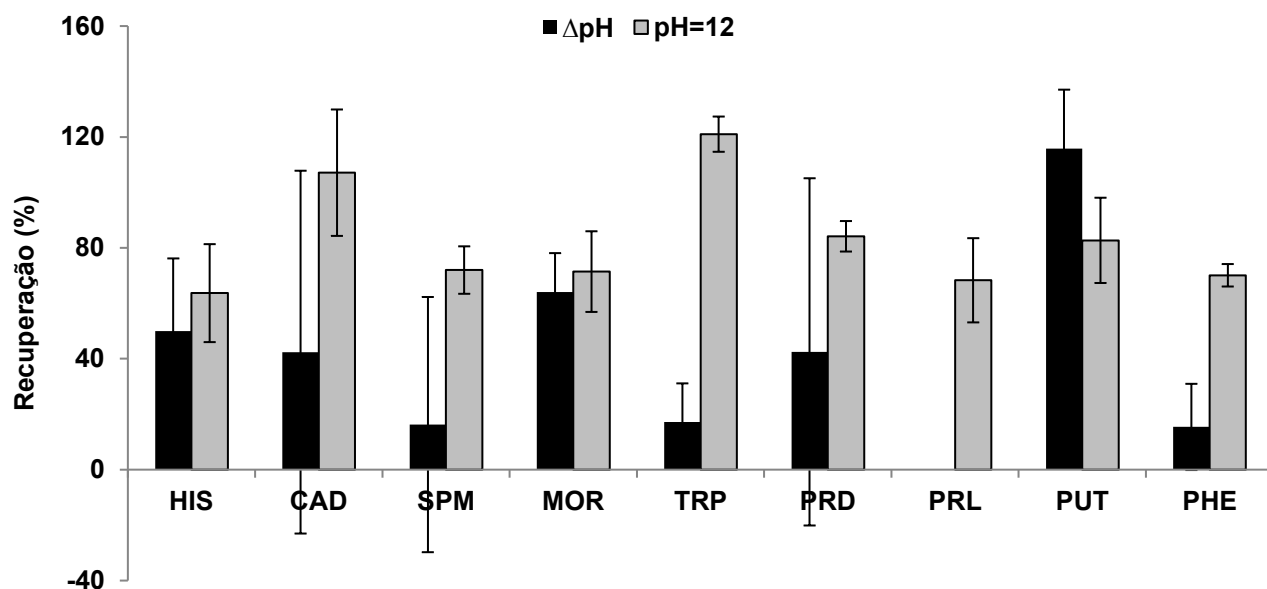


Tabela 23: Resultados do teste Tukey HSD em termos de recuperação quando avaliado solvente extrator alcalino seguido da acidificação do extrato

pH	Recuperações (%)								
	HIS	CAD	SPM	MOR	TRP	PRD	PRL	PUT	PHE
pH = 12	64 ^a	105 ^a	72 ^a	71 ^a	121 ^a	84 ^a	68 ^a	83 ^a	70 ^a
Δ pH	43 ^b	34 ^b	12 ^b	54 ^b	15 ^b	34 ^b		158 ^a	13 ^a

O método empregando solvente alcalinizado e a acidificação do extrato não foi eficiente na extração das BAs, tendo havido uma redução nas recuperações de todos os analitos, e no caso da PRL não foi possível extraí-lo.

A Figura 27 representa os resultados obtidos no estudo do efeito matriz e a Tabela 24 os resultados de diferença significativa relativo às diferentes condições avaliadas. O empregado do solvente alcalinizado e a acidificação do extrato resultou na redução do efeito matriz para a TRP, MOR e a PHE, entretanto, apesar dessa redução, o efeito matriz continua sendo alto em ambos os casos. Relativamente aos restantes compostos, apesar do teste de Tukey apresentar a existência de diferença significativa, o efeito matriz continua sendo alto, de acordo com os órgãos regulamentadores (SANTE, 2017).

Figura 27: Efeito matriz quando avaliado o uso de solvente alcalinizado seguido da acidificação do extracto. O volume do solvente empregado foi de 5 mL e a massa de amostra de 3g

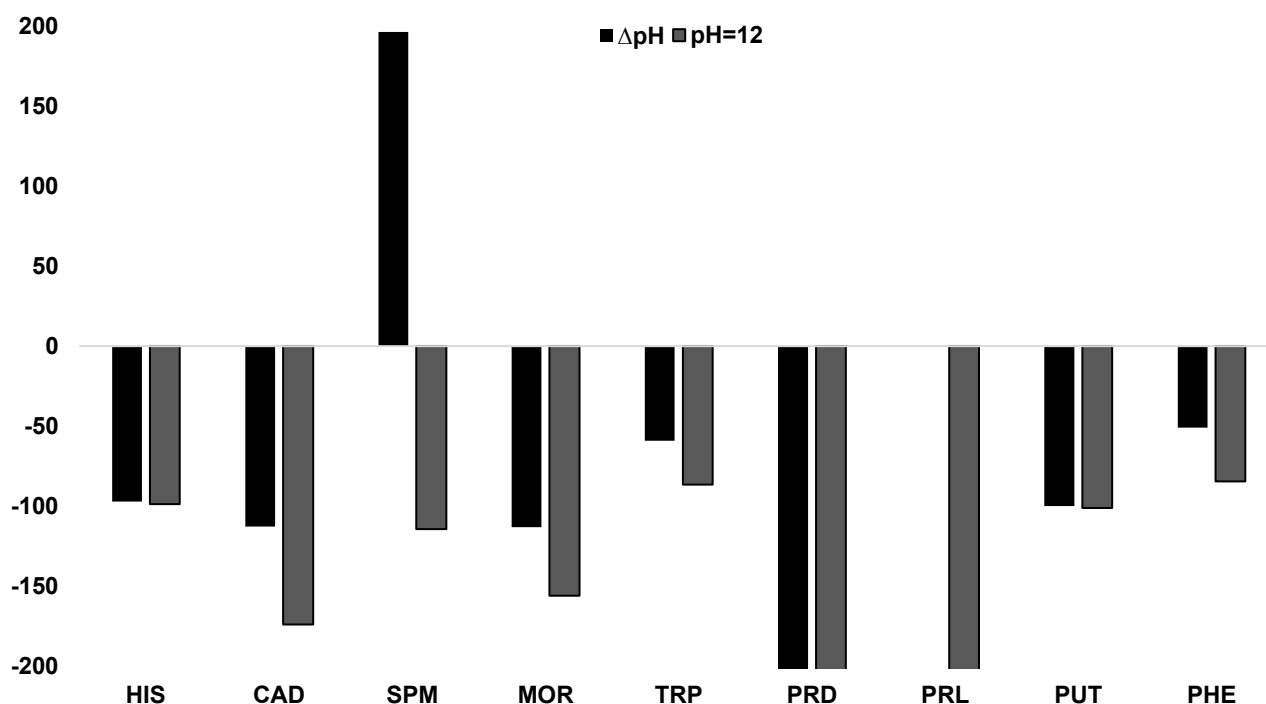


Tabela 24: Resultados do teste Tukey HSD para o efeito matriz quando avaliado o uso do solvente extrator seguido de acidificação do extrato

Efeito matriz (%)									
pH	HIS	CAD	SPM	MOR	TRP	PRD	PRL	PUT	PHE
pH = 12	-99 ^b	-174 ^b	-114 ^b	-156 ^b	-87 ^b	-378 ^a	-228	-101 ^b	-84 ^b
ΔpH	-97 ^a	-113 ^a	196 ^a	-113 ^a	-59 ^a	-1892 ^b		-100 ^a	-51 ^a

Considerando que houve redução nas recuperações de todas as BAs avaliadas no presente estudo e que o efeito matriz foi alto para todos os compostos, recomenda-se que a extração destes analitos seja realizada apenas empregando solvente extrator alcalino a pH 12.

Mediante os resultados obtidos no referente estudo empregando a RP-LC e a HILIC, e atendendo ainda à natureza hidrofílica das BAs e sua capacidade de ser ionizada, é aconselhável que a análise seja realizada empregando sílica não derivatizada

como fase estacionária e fase móvel composta por acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1% e água ultrapura acidificada com ácido fórmico 0,1% e 50 mM de formiato de amônio. A eficiência de recuperação das BAs é fortemente influenciada pela seleção do solvente extrator apropriado (RICHARD *et al.*, 2011). As propriedades dos solventes como pka, polaridade, viscosidade e pH foram fatores determinantes na eficiência extrativa dos analitos. Recomenda-se que a extração das BAs seja realizada empregando a USLE, com solvente extrator a pH 12.

6. CONCLUSÕES

Atendendo à polaridade das BAs, o emprego da HILIC apresenta-se como uma boa estratégia para a análise destes compostos, por promover uma maior retenção conforme evidenciado pelos valores de k , além de uma maior eficiência na separação.

Os melhores resultados em termos de perfil cromatográfico dos picos e eficiência de separação foram obtidos empregando a coluna Atlantis HILIC, modo de eluição por gradiente, empregando como fase móvel acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1% e água ultrapura acidificada com ácido fórmico 0,1% e 50 mM de formiato de amônio, e um tempo total de análise de 11 min para 10 BAs.

Medidas como, a acidificação do solvente extrator, ou acidificação do extrato após extração com solvente alcalino, ou ainda o estudo da faixa de pH de 2 a 12 não foram eficientes na redução de co-extrativos.

O estudo do efeito de sorventes indicou que os melhores resultados em termos de recuperação e efeito matriz foram obtidos quando não se emprega a etapa adicional de limpeza por d-SPE, o que afigura-se como uma vantagem não só em termos de aspetos econômicos, mas também pela redução do tempo de preparo de amostra, entretanto, o estudo do efeito matriz indica a necessidade da correção do mesmo.

Os compostos mais afetados pelo efeito matriz foram a PRD e a PRL devido à menor massa molecular, e a SPM, o que está relacionada à sua maior polaridade.

Os melhores resultados em termos de recuperação das BAs foram obtidos empregando solvente extrator a pH 12, com recuperações entre 64 e 121%.

7. TRATAMENTO DOS RESÍDUOS

Os resíduos gerados neste trabalho foram recolhidos, armazenados, rotulados de acordo com as normas definidas pela comissão de resíduos da EQA, e armazenados para posterior recolhimento e tratamento pela FURG.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar o potencial bactericida da quitosana no controle da formação das BAs, aliando o potencial dos resíduos da indústria pesqueira na produção deste polímero e o seu emprego na obtenção de produtos com constante padrão de qualidade.
- Avaliar o efeito do congelamento ou uso do gelo seco na minimização de interferentes como proteínas e gorduras.
- Avaliar o efeito da diminuição da quantidade de amostra e a redução do volume injetado na redução do efeito matriz.
- Delinear estratégias de otimização da separação cromatográfica por forma a podem reduzir o efeito matriz.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEB. **1º anuário brasileiro de pesca e aquicultura**. Rio de Janeiro. 2014.

AFLAKI, F. *et al.* Determination of biogenic amines in Persian Gulf fish: application of stirrer bead milling extraction method. **Food Measure**, v. 9, p. 86–94, 2015.

ALAM, S. M.; BASKAR, A.; SIDDIQ, A. M. The density, dynamic viscosity and kinematic viscosity of protic polar solvents (pure and mixed systems) studies: A theoretical insight of thermophysical properties. **Journal of Molecular Liquids**, 2017.

ALDHABI, N. A. A; PONMURUGAN, K. A; JEGANATHAN, P. M. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 206–213, 2017.

ALPERT, A. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography**. v. 499, p. 177-196, 1990.

ANVISA; Ministério da Saúde. Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017, Diário Oficial da União nº141, de 25 de julho de 2017.

AOAC Official Method977.13 (2002). Histamine in seafood–Fluorometric method. Official Methods of Analysis of AOAC International, II 35, 17–19.

ARIAS, J. L. O; ROMBALDI, C.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 66–75, 2014.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 2–8, 2015.

BÉNÉ, C. *et al.* Contribution of fisheries and aquaculture to food security and poverty reduction: assessing the current evidence. **World Development**, v. 79, p. 177-196, 2016. ISSN 0305-750X.

BIJI, K. *et al.* Biogenic amines in seafood: a review. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1-9, 2016.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos** – 1ª Ed. – Rio de Janeiro: LTC, 2015. ISBN: 978-216-2694-7.

BRASIL. Portaria n. 185, 13 de Maio de 1997. O Ministério da Agricultura e do Abastecimento aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e eviscerado). Diário Oficial da União, Brasília, n.93, 19 de Maio de 1997. Seção 1, p.10.283-3.

BRAUTBAR, N. HEPATOTOXICITY. In WYPYCH, G., **Handbook of Solvents: Use, Health, and Environment** - 2ª Ed., volume 2. Toronto: ChemTec Publishing, 2014. p. 603-618. ISBN: 978-1-895198-65-2

BUSZEWSKI, B.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p.231–247, 2012.

CABRERA, *et al.* Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 227-240, 2012.

CALDAS, S. S. *et al.* Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 146, p. 676-688, 2016.

CAPPIELLO, A. *et al.* Matrix effects in liquid chromatography-mass Spectrometry. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 33, p. 1067–1081, 2010.

CARR, P. W.; STOLL, D. R. **Two-dimensional liquid chromatography: Principles, Pratical implementation and applications**, Agilent Technologies, Inc: Alemanha, 2015.

CECH, N. B.; ENKE, C. G. Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 2717–2723, 2000.

CERQUEIRA, M. B. R.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe for the extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge. **Journal of Chromatography A**, v. 1336, p. 10–22, 2014.

CHABAN, V. V.; N. A. ANDREEV. Solvation of the morpholinium cation in acetonitrile. Effect of an anion. **Journal of Molecular Modeling**, p. 22: 26, 2016.

CHATZIMITAKOS, T. *et al.* Ion-pair assisted extraction followed by ^1H NMR determination of biogenic amines in food and biological matrices. **Food Chemistry**, v. 202, p. 445–450, 2016.

CHEMAT, F. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 2017.

CHIN, C.; ZHANG, Z. P.; KARNES, H. T. A study of matrix effects on a LC–MSMS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 1149–1167, 2004.

CHIU, M. L., *et al.* Matrix EffectsdA Challenge Toward Automation of Molecular Analysis. **Technology Review**. v. 15, p. 233–42, 2010.

CODEX ALIMENTARIOS, Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, Comité del Codex sobre pescado y productos pesqueros, 2012.

Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.

DONG, H.; XIAO, K. Modified QuEChERS combined with ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine seven biogenic amines in Chinese traditional condiment soy sauce. **Food Chemistry**, v. 229, 502–508, 2017.

DOTTO, G. L.; FILHO, S. P.; PINTO, L. A.A. **Frontiers in Biomaterials: Chitosan Based Materials and its Applications**. Bentham e Books imprint. 2017. ISBN 978-1-68108-486-2.

DRANCA, F.; OROIAN, M. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 637–646, 2016.

EUROPEAN COMMISSION, SANTE/11813/2017. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed**, 2017.

EVANGELISTA, W. P. *et al.* Quality assurance of histamine analysis in fresh and canned fish. **Food Chemistry**, v. 211, p.100-106, 2016.

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

FAO. **Risk Based Imported Food Control Manual**. Rome: 2016a. ISBN 978-92-5-109070-1.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Contributing to food security and nutrition for all**. Rome: 2016b. ISBN 978-92-5-109185-2.

FAO/WHO. **Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products**. Rome: 2014. ISBN 978-92-5-107850.

FDA. **Fish and fishery products hazards and controls guidance**. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2011

FIEDLER, J. L. *et al.* Strengthening the contribution of aquaculture to food and nutrition security: The potential of a vitamin A-rich, small fish in Bangladesh. **Aquaculture**, v. 452, p. 291-303, 2016.

FU, Y. *et al.* High-sensitivity detection of biogenic amines with multiple reaction monitoring in fish based on benzoyl chloride derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 1465, p. 30–37, 2016.

GALVÃO, J. **Qualidade e Processamento de Pescado**. 1ª Ed. São Paulo: 2014. ISBN 978-85-352-7607-7.

GOMEZ, M. R. *et al.* The evaluation of matrix effects in pesticide multiresidue methods via matrix fingerprinting using liquid chromatography electrospray high resolution mass spectrometry. **Analytical Methods**, 2016.

GONZALEZ, D. M. *et al.* Matrix-effect free quantitative Liquid Chromatography Mass Spectrometry analysis in complex matrices using nanoflow LC with integrated emitter tip and high dilution factors. **Journal of Chromatography A**, v. 1519, p. 110-120, 2017.

GOSETTI, F. *et al.* Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 907–916, 2013.

GRITTI, F. The relative importance of the adsorption and partitioning mechanisms in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1376, p. 112–125, 2015.

GROSSMANN, L. *et al.* Effect of precipitation, lyophilization, and organic solvent extraction on preparation of protein-rich powders from the microalgae *Chlorella protothecoides*. **Algal Research**, v. 29, p. 266–276, 2018.

GUO, Y.; WANG, X. HILIC METHOD DEVELOPMENT. In Olsen, B. A., Pac, B. W., **Hydrophilic Interaction Chromatography: A Guide for Practitioners**. New Jersey: Wiley: Hoboken, 2013, p. 87–107.

HAHN, T.; BOTZENHART, K.; SCHWEINSBERG F. Toxic Effects of Solvent Exposure: Toxicokinetics, toxicodynamics, and toxicology. In WYPYCH, G., **Handbook of Solvents: Use, Health, and Environment** - 2^a Ed., volume 2. Toronto: ChemTec Publishing, 2014. p. 535–546. ISBN: 978-1-895198-65-2.

HALL, T. G. *et al.* Identifying and Overcoming Matrix Effects in Drug Discovery and Development. In PRASAIN, J., **Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles**. Shangha: InTechi, 2012, p. 389-420. ISBN: 978-953-51-0141-3.

HE, B. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. **Food Chemistry**, v. 204, p. 70–76, 2016b.

HE, L. *et al.* Simultaneous determination of aliphatic, aromatic and heterocyclic biogenic amines without derivatization by capillary electrophoresis and application in beer analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1482, p. 109-114, 2016a.

HEATON, J. C., *et al.* Practical observations on the performance of bare silica in hydrophilic interaction compared with C18 reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1328, p. 7–15, 2014.

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.

HEWAVITHARANA, A. K.; TAN, S. K.; SHAW, P. N. Strategies for the Detection and Elimination of Matrix Effects in Quantitative LC–MS Analysis. **LCGC Asia Pacific**, v. 17, p. 1-2. 2014.

HULTGREN, A.; RAU, D. C. Exclusion of Alcohols from Spermidine-DNA Assemblies: Probing the Physical Basis of Preferential Hydration. **Biochemistry**, v. 43, p. 8272-8280, 2004.

IBRAHIM, M.E.A; LUCY C. A. Stationary phases for HILIC. In Olsen, B. A., Pac, B. W., **Hydrophilic Interaction Chromatography: A Guide for Practitioners**. Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2013; pp 43-77.

ISMAIL, B.; NIELSEN, S. S. Basic Principles of Chromatography. In **Food Analysis**, Springer, Boston, MA, 2010, pp 473-498. ISBN: 978-1-4419-1478-1.

IVERSON, C. D.; GU, Z.; LUCY, C. A. The hydrophilicity vs. ion interaction selectivity plot revisited: The effect of mobile phase pH and buffer concentration on hydrophilic interaction liquid chromatography selectivity behavior. **Journal of Chromatography A**, v. 1458, p. 82–89, 2016.

JANDERA, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 692, p. 1-25, 2011.

JASTRZEBSKA *et al.* Application of 3,5-bis-(trifluoromethyl)phenyl isothiocyanate for the determination of selected biogenic amines by LC-tandem mass spectrometry and ¹⁹F NMR. **Food Chemistry**, v. 239, p. 225–233, 2018.

KACZYNSKI, P. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. **Food Chemistry**, v. 230, p. 524–531, 2017.

KAKATKAR, A. S.; GAUTAM, R. K.; SHASHIDHAR, R. Combination of glazing, nisin treatment and radiation processing for shelf-life extension of seer fish (*Scomberomorus guttatus*) steaks. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 130, p. 303-305, 2017.

KALIKOSKI, D. C. Estudo das condições técnicas, econômicas e ambientais da pesca de pequena escala no estuário da Lagoa dos Patos, Brasil: uma metodologia de avaliação. **FAO, Circular de Pesca e Aquicultura**, n. 1075, 2013.

KEBARLE, P.; VERKERK, U. H. On the Mechanism of Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESIMS). In COLE, R. B. **Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological Applications-2^a Ed**, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010. ISBN 978-0-471-74107-7.

KILBURN, K. H. Toxicity of environmental solvent exposure For brain, lung and heart. In WYPYCH, G., **Handbook of Solvents: Use, Health, and Environment - 2^aEd.**, volume 2. Toronto: ChemTec Publishing, 2014. p. 619-633. ISBN: 978-1-895198-65-2.

KILCOYNEA, J.; FUXB, E. Strategies for the elimination of matrix effects in the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of the lipophilic toxins okadaic acid and azaspiracid-1 in molluscan shellfish. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7123-7130, 2010.

KOMI, D.; HAMBLIN, M. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. **International Journal of Advanced Research**. v. 4, n. 3, p. 411-427, 2016.

KONIECZNA, L. *et al.* Analytical approach to determining human biogenic amines and their metabolites using eVolmicroextraction in packed syringe coupled to liquid chromatography mass spectrometry method with hydrophilic interaction chromatography column. **Talanta**, v. 150, p. 331–339, 2016.

KOSE, S. *et al.* Biogenic amine contents of commercially processed traditional fish products originating from European countries and Turkey. **European Food Research and Technology**, v. 235, p. 669–683, 2012.

KOUPPARIS, M. A.; MEGOULAS, N. C.; GREMILOGIANNI, A. M. HILIC for food, environmental, and other applications. In Olsen, B. A., Pac, B. W., Eds., **Hydrophilic Interaction Chromatography: A Guide for Practitioners**. New Jersey: Wiley: Hoboken, 2013, p. 239–264.

KRÍZEK, M. *et al.*, Comparison of the formation of biogenic amines in irradiated and smoked fish. *European Food Research and Technology*, v. 243, p. 1989–1995, 2017.

LI, G. *et al.* Simultaneous determination of biogenic amines and estrogens in foodstuff by an improved HPLC method combining with fluorescence labeling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 355-361, 2014.

LÓPEZ, E.S.; CREGO, A.; MARINA, M.L. Design of strategies to study the metabolic profile of highly polar compounds in plasma by reversed-phase liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1490, p. 156-165, 2017.

MAQUEDA, D. M., *et al.* Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion. In TOLDRÁ, F.; NOLLET, L. M. L., **Proteomics in Foods: Principles and Applications**. Boston: Springer, 2013, p. 21-50. ISBN: 978-1-4614-5626-1.

MCCALLEY, D. V. Study of retention and peak shape in hydrophilic interaction chromatography over a wide pH range. **Journal of Chromatography A**, v.1411, p. 41-49, 2015.

MCCALLEY, D. V. Separation mechanisms in hydrophilic interaction chromatography. In Olsen, B. A., Pac, B. W., **Hydrophilic Interaction Chromatography: A Guide for Practitioners**. New Jersey: Wiley: Hoboken, 2013, p. 1-41.

MCCALLEY, D. V. Effect of mobile phase additives on solute retention at low aqueous pH in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1483, p. 71-79, 2017a.

MCCALLEY, D. V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1523, p. 49-71, 2017b.

MCKEEN, L. W. Solvent Systems. In MCKEEN, L. W. **Fluorinated coatings and finishes handbook: the definitive user's guide and databook**- 2^a Ed, Nova Yorque: William Andrew Publishing., 2006, p. 77-87. ISBN-10: 0-8155-1522-7.

MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**-4th ed, Editora John Wiley & Sons, Ltd: Weinheim, 2004. ISBN: 0-470-09377-3.

MOHAMMED, G. *et al.* A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 78, p. 84-94, 2016.

MOHEDANO, M. L. Controlling the formation of biogenic amines in fermented foods. **Advances in Fermented Foods and Beverages**, 2015.

MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. Solvents, Buffers, and Additives Used in the Mobile Phase. In MOLDOVEANU, S. C., **Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2017a, p. 393-450. ISBN: 9780128037119.

MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. Polar Analytical Columns. In MOLDOVEANU, S. C., **Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis**, Elsevier: Amsterdam, 2017b, p. 329-347. ISBN: 9780128037119.

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.

MOON, J. S. *et al.* Analysis of Biogenic Amines in Fermented Fish Products Consumed in Korea. **Food Science and Biotechnology**, v.19, p. 1689-1692, 2010.

MORATALLA, M. Processing Contaminants: Biogenic Amines. **Encyclopedia of Food Safety**, v. 2, p. 381–391, 2014.

MORATALLAA, M. L. L. *et al.* Validation of an ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7715–7720, 2009.

NGUYEN, H. P. *et al.* HILIC-MS for targeted metabolomics and small molecule bioanalysis In Olsen, B. A., Pac, B. W. **Hydrophilic Interaction Chromatography: A Guide for Practitioners**. New Jersey: Wiley: Hoboken, 2013; pp 219–231.

ONAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1475-1486, 2007.

ORDÓÑEZ, J. L. Recent Trends In The Determination Of Biogenic Amines In Fermented Beverages - A Review. **Analytica Chimica Acta**, v. 939, p. 10-25. 2016.

OTTINGER, M.; CLAUSS, K.; KUENZER, C. Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments—A review. **Ocean & Coastal Management**, v. 119, p. 244-266, 2016.

OZOGUL, F.; OZTEKIN, R.; KULAWIK, P. Biogenic Amine Formation and Microbiological Quality of Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) Treated with Lavender and Lemon Balm Ethanol Extracts. **Journal of Food Science**, v. 82, p. 1278-1284, 2017.

PAPAGEORGIOU, M. *et al.* Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 128-142, 2018.

PARCHAMI, R.; KAMALABADI, M.; ALIZADEH, N. Determination of biogenic amines in canned fish samples using head-space solid phase microextraction based on nanostructured polypyrrole fiber coupled to modified ionization region ion mobilityspectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1481, p. 37–43, 2017.

PENG, L. Q. *et al.* Determination of natural phenols in olive fruits by chitosan assistedmatrix solid-phase dispersion microextraction and ultrahighperformance liquid chromatography with quadrupole time-of-flighttandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1456, p. 68–76, 2016.

PICÓ, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 84-99, 2013.

PLOTKA W.J. *et al.* Extraction with environmentally friendly solvents. **Trends in Analytical Chemistry**, v.91, p. 12-25, 2017.

POHANISH, R.P. **Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemical Carcinogens**. 6. Ed. New York: William Andrew Publisher, 2012. ISBN-13: 978-1-4377-7869-4.

PRADAL, D. *et al.* Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p. 137–146, 2016.

RABEL, F. Advances in hydrophilic interaction Chromatography (HILIC) for Biochemical applications. In Olsen, B. A., Pac, B. W., **Hydrophilic Interaction Chromatography: A Guide for Practitioners**. New Jersey: Wiley: Hoboken, 2013; pp 195-211.

RICHARD, N. L. *et al.* Impact of quality parameters on the recovery of putrescine and cadaverine in fish using methanol-hydrochloric acid solvent extraction. **Journal of AOAC International**, v. 94, p. 77-88, 2011.

RICHARD, N. L. *et al.* Effect of matrix on recovery of biogenic amines in fish. **Journal of AOAC International**, v. 91, p. 768-776, 2008.

ROMBALDI, C. *et al.*; New environmentally friendly MSPD solid support based on golden mussel shell: characterization and application for extraction of organic contaminants from mussel tissue. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p: 4805–4814, 2015.

ROSEIRO, L.C. *et al.* Susceptibility of dry-cured tuna to oxidative deterioration and biogenic amines generation: I. Effect of NaCl content, antioxidant type and ageing. **Food Chemistry**, v. 228, p. 26–34, 2017.

SAAID, M. *et al.* Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1356-1362, 2009.

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.

SELF, R.L.; WU, W.H. Determination of eight biogenic amines in selected seafood products by MSPD extraction followed by UHPLC-Orbitrap MS. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 27 p. 169–173. 2012.

SELF, R.L.; WU, W.H.; MARKS, H. S. Simultaneous Quantification of Eight Biogenic Amine Compounds in Tuna by Matrix Solid-Phase Dispersion followed by HPLC_Orbitrap Mass Spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 59 p. 5906–5913. 2011.

SEMERARO, A. A. *et al.* European official control of food: Determination of histamine in fish products by a HPLC–UV-DAD method. **Food Chemistry**, v. 211, p. 694–699, 2016.

SENTELLAS, S.; NÚÑEZ, Ó.; SAURINA, J. Recent advances in the determination of biogenic amines in food samples by (U) HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016.

SHEIKHA, A. F; XU, J. Traceability as a Key of Seafood Safety: Reassessment and Possible Applications. **Reviews in fisheries science & aquaculture**, v. 25, p. 158–170, 2017.

SILVA., C.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C. Cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC): estado da arte e aplicações. **Química Nova**. v. 39, n. 2, p. 210-220, 2016.

SINGH, S. *et al.* Antimicrobial seafood packaging: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 2505–2518, 2016.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 328– 334, 2005.

TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100–109, 2015.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIESNIK, J. Greener organic solvents in analytical chemistry. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, p. 1-4, 2017.

TOFALO, R. *et al.* Biogenic Amines: Toxicology and Health Effect. In: (Ed.). **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p.424-429. ISBN 978-0-12-384953-3.

TRUFELLI, H. *et al.* An overview of matrix effects in liquid Chromatography–mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, p. 491– 509, 2011.

VIAN, M. *et al.* Green solvents for sample preparation in analytical chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, p. 44-48, 2017

XU, D. P. *et al.* Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. **Food Chemistry**, v. 217, p. 552–559, 2017.

XU, J. *et al.* Metal oxides in sample pretreatment. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 80, 41-56, 2016.

YANG, P. Effect of Sample Dilution on Matrix Effects in Pesticide Analysis of Several Matrices by Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 5169–5177, 2015.

ZANELA, R. *et al.* QuEChERS, In BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C., **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos** – 1. Ed.. Rio de Janeiro: LTC, 2015. ISBN: 978-216-2694-7

ZANELA, R. *et al.* Advanced Sample Preparation Techniques for Pesticide Residues Determination by HRMS Analysis. In GONZÁLEZ, R. R.; FRENICH, A. G, **Applications in High Resolution Mass Spectrometry: Food Safety and Pesticide Residue Analysis**. USA: Elsevier, 2017. p. 131–164. ISBN: 978-0-12-809464-8.

ZARE, D.; GHAZALI, H. M. Assessing the quality of sardine based on biogenic amines using a fuzzy logic model. **Food Chemistry**, v. 221, p. 936–943, 2017.

ZHANG, W. *et al.* A new kinetic model of ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from Chinese chive. **Food Chemistry**, v. 212, p. 274–281, 2016.

ZOTOU, A.; NOTOU, M. Enhancing fluorescence LC analysis of biogenic amines in fish tissues by precolumn derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 89-99, 2012.

ZUBIAGUIRRE, L. B. *et al.* Focused ultrasound solid–liquid extraction for the determination of organic biomarkers in beachrocks. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 430–439, 2015.

11. PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DE MESTRADO

Artigo aceito para publicação

Marta-Sanchez, Ana Victoria; Caldas, Sergiane; Schneider, Antunielle; Cardoso, Sônia Maria; Primel, Ednei. Trace analysis of parabens preservatives in drinking water treatment sludge, treated and mineral water samples by Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry. **Environmental Science and Pollution Research**.

Artigo submetido

CARDOSO, Sônia M.V.S.; MARUBE, Liziane C.; CALDAS, Sergiane S.; PRIMEL, Ednei G. Evaluation of reversed-phase liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography in the retention, separation and peak chromatographic profile of 10 biogenic amines - **Journal of Chromatography A** (06/03/2018).

Participação em eventos

016 - 15ª Mostra da Produção Universitária. Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Rio Grande, Brasil.

2016 - XXIII Encontro Regional da Região Sul: Química e Suas Linguagens em um Universo de Inovações

2017 - 57º Congresso Brasileiro de Química

2017 - 16ª Mostra da Produção Universitária. Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Rio Grande, Brasil.

Trabalhos publicados em anais de eventos

CARDOSO, Sônia M.V.S; MARUBE, Liziane C.; CALDAS, Sergiane S.; PRIMEL, Ednei G. Otimização das condições de separação e detecção das aminas biogênicas empregando LC-ESI-MS/MS In: 15ª Mostra da Produção Universitária, 2017, Rio Grande

CARDOSO, Sônia M.V.S; MARUBE, Liziane C.; CALDAS, Sergiane S.; PRIMEL, Ednei G. Avaliação da extração sólido-líquido assistida por ultrassom seguida de uma etapa de limpeza por D-SPE na redução do efeito de matriz na detecção das aminas biogênicas em amostras de pescado In: 57º Congresso Brasileiro de Química, 2017, Gramado.

CARDOSO, Sônia M.V.S; TURCHETTO, A.; CALDAS, Sergiane S.; PRENTICE, C. PRIMEL, Ednei G. Desenvolvimento de método empregando extração sólido-líquido assistida por ultrassom para a determinação da histamina em amostras de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) In: XXIII Encontro Regional da Região Sul: Química e Suas Linguagens em um Universo de Inovações, 2016, Santa Maria.

SCHNEIDER, A.; SANCHEZ A. V.M.; **CARDOSO, Sônia M.V.S;** ANDRADE. J.A.B.; CALDAS, Sergiane S.; PRIMEL, Ednei G. Estudo de método empregando SPE e LCMS/MS para extração de parabenos em amostras de água In: XXIII Encontro Regional da Região Sul: Química e Suas Linguagens em um Universo de Inovações, 2016, Santa Maria.

12. ANEXO

10.1. Condições de eluição empregadas para a coluna C18 XTerra

Tabela 25: Condição de eluição 1 empregada no modo gradiente para a coluna C18 XTerra

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA	Acetonitrila com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	60	40	0,2
5	10	90	
10	0	100	
12	60	40	
17	60	40	

Tabela 26: Condição de eluição 2 empregada no modo gradiente para a coluna C18 XTerra

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA	Acetonitrila com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	90	10	0,2
10	10	90	
11	90	10	
16	90	10	

Tabela 27: Condição de eluição 3 empregada no modo gradiente para a coluna C18 XTerra

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA	Acetonitrila com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	90	10	0,2
10	80	20	
11	90	10	
16	90	10	

Tabela 28: Condição de eluição 4 empregada no modo gradiente para a coluna C18 XTerra

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA	Acetonitrila com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	98	2	0,2
10	85	15	
11	98	2	
16	98	2	

Figura 28: Cromatograma no modo SRM obtidos na condição de eluição 1 empregando a coluna C18 XTerra

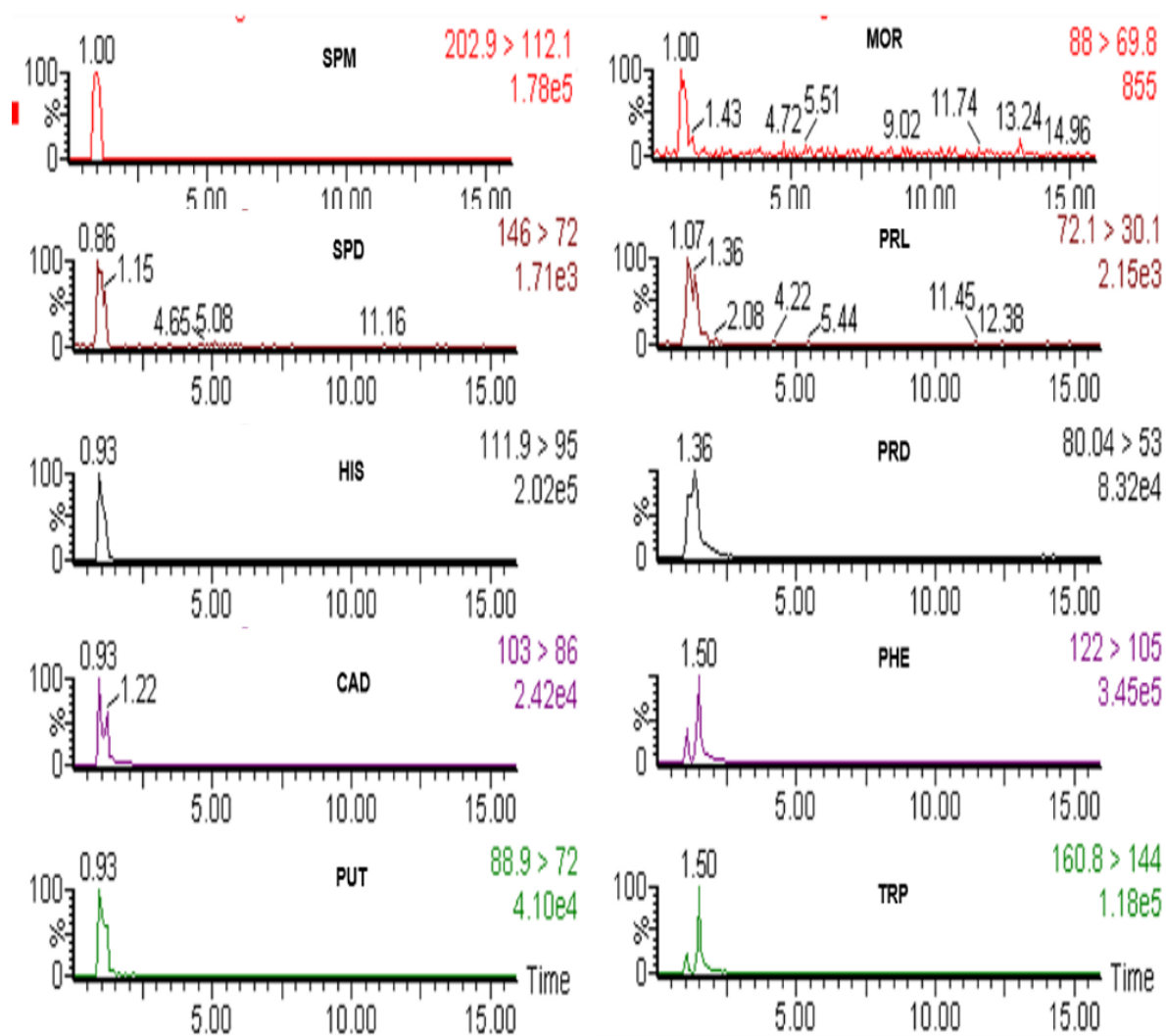


Figura 29: Cromatograma no modo SRM obtido na condição de eluição 2 empregando a coluna C18 XTerra

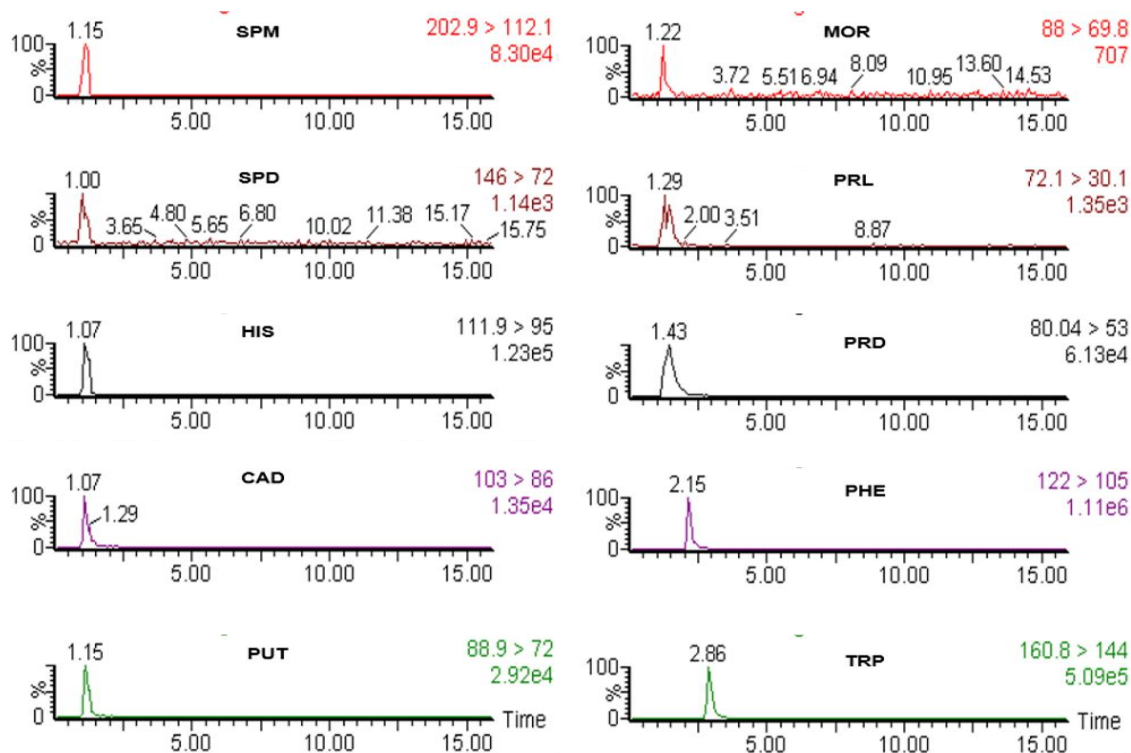


Figura 30: Cromatograma no modo SRM obtido pela condição de eluição 3 empregando a coluna C18 XTerra

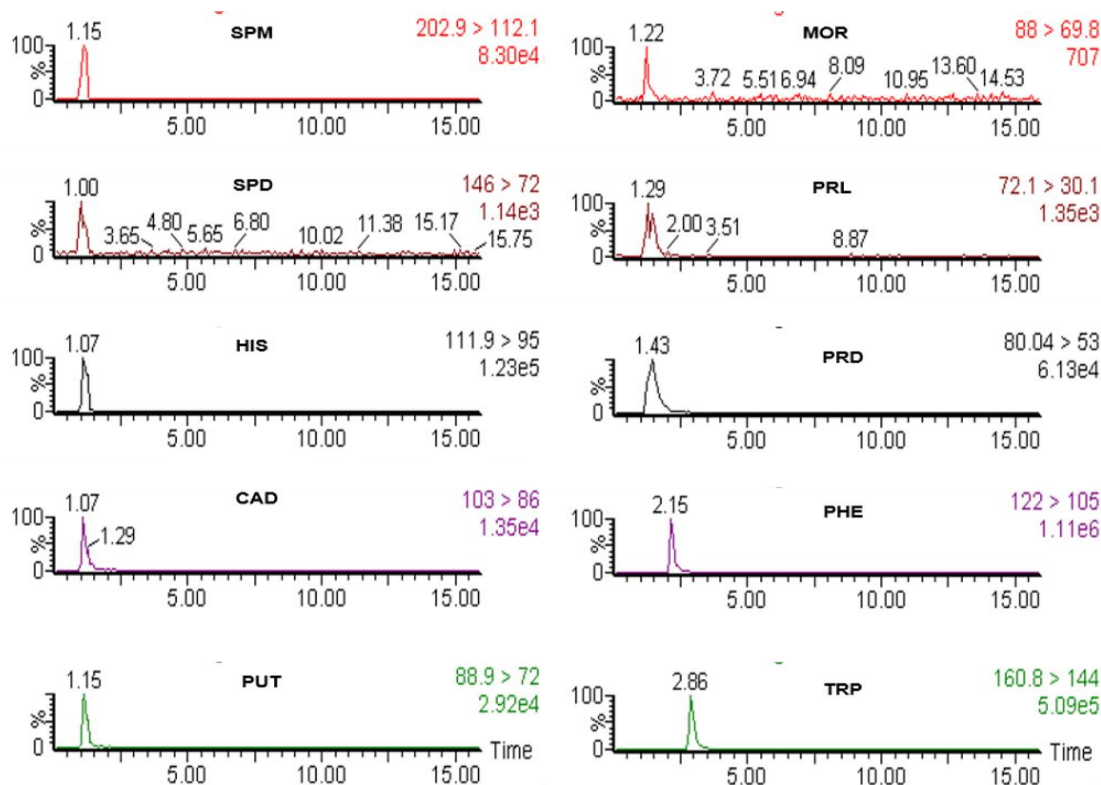
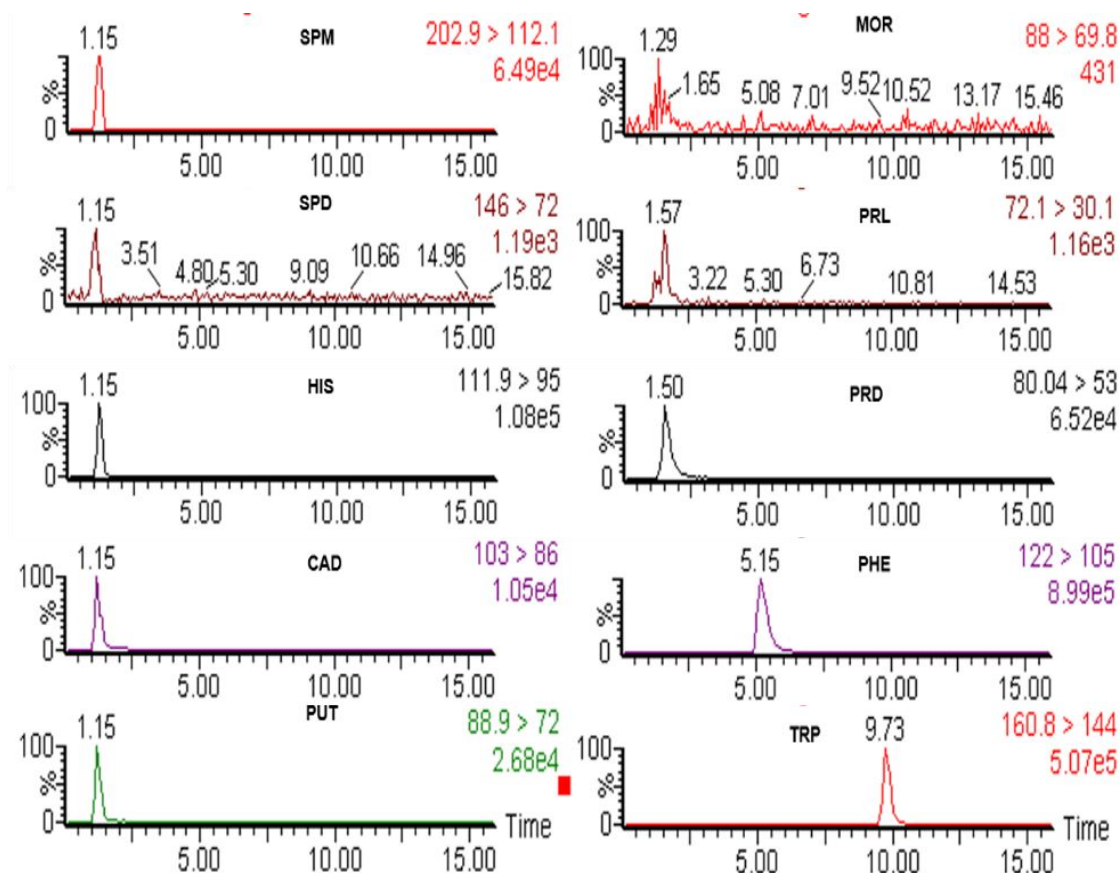


Figura 31: Cromatograma no modo SRM obtido pela condição de eluição 4 empregando a coluna C18 XTerra



10.2. Condições de eluição empregadas para a coluna Luna HILIC

Tabela 29: Condição de eluição 1 empregada no modo gradiente para a coluna Luna HILIC

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA + 10mM AF	ACN com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	10	90	0,2
10	80	20	
11	10	90	
16	10	90	

Tabela 30: Condição de eluição 2 empregada no modo gradiente para a coluna Luna HILIC

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA + 10mM AF	ACN com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	10	90	0,2
10	80	20	
15	80	20	
16	10	90	
21	10	90	

Tabela 31: Condição de eluição 3 empregada no modo gradiente para a coluna Luna HILIC

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA + 10mM AF	ACN com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	10	90	0,2
10	70	30	
12	90	10	
15	90	10	
16	10	90	
21	10	90	

Tabela 32: Condição de eluição 4 empregada no modo gradiente para a coluna Luna HILIC

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA + 10mM AF	ACN com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	10	90	0,2
10	90	10	
12	100	0	
15	100	0	
16	10	90	
21	10	90	

Tabela 33: Condição de eluição 5 empregada no modo gradiente para a coluna Luna HILIC

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA + 10mM AF	ACN com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	30	70	0,2
10	90	10	
12	100	0	
15	100	0	
16	30	70	
21	30	70	

Figura 32: Cromatograma no modo SRM obtido empregando a condição de eluição 1 na coluna Luna HILIC

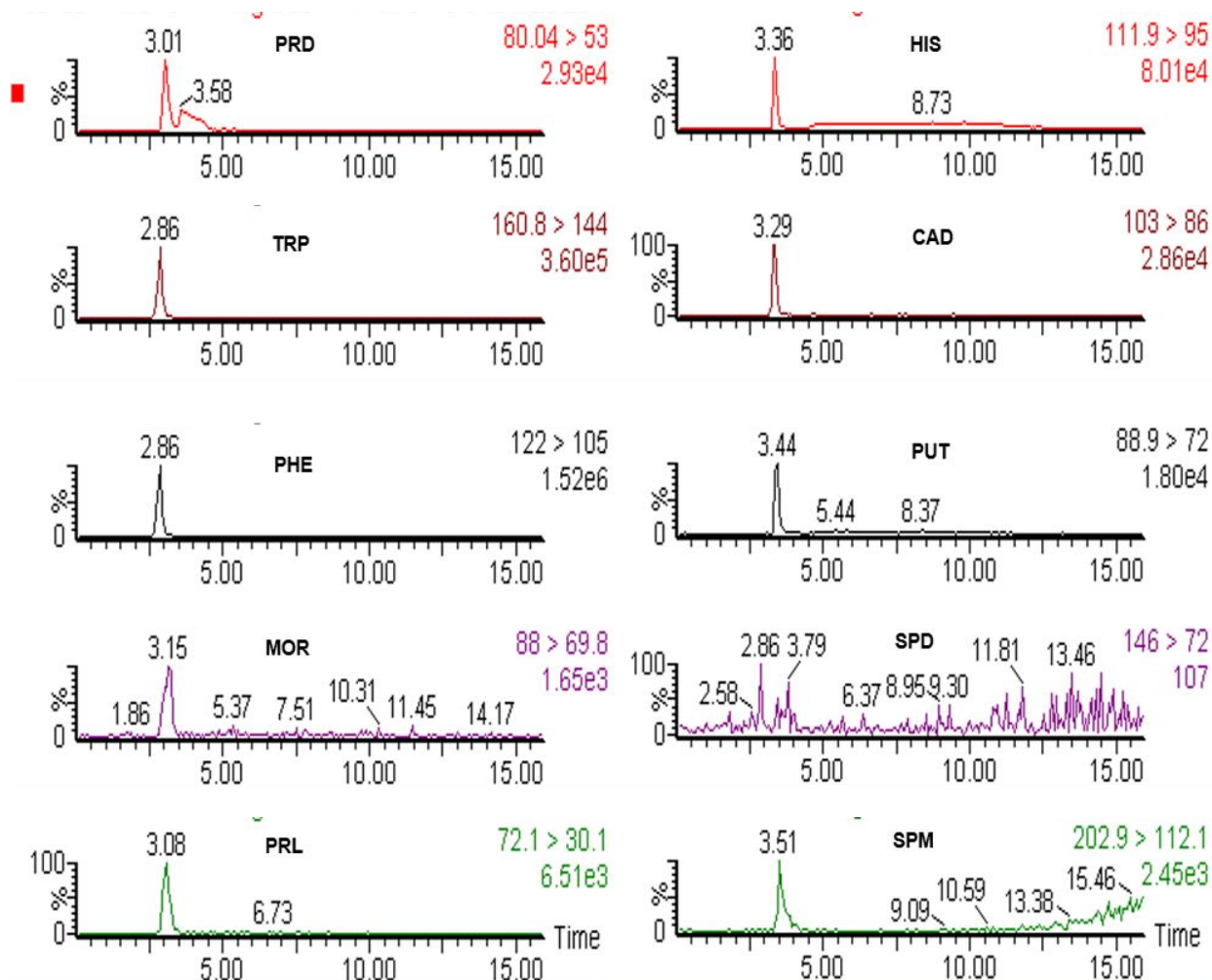


Figura 33: Cromatograma no modo SRM obtido empregando a condição de eluição 2 na coluna Luna HILIC

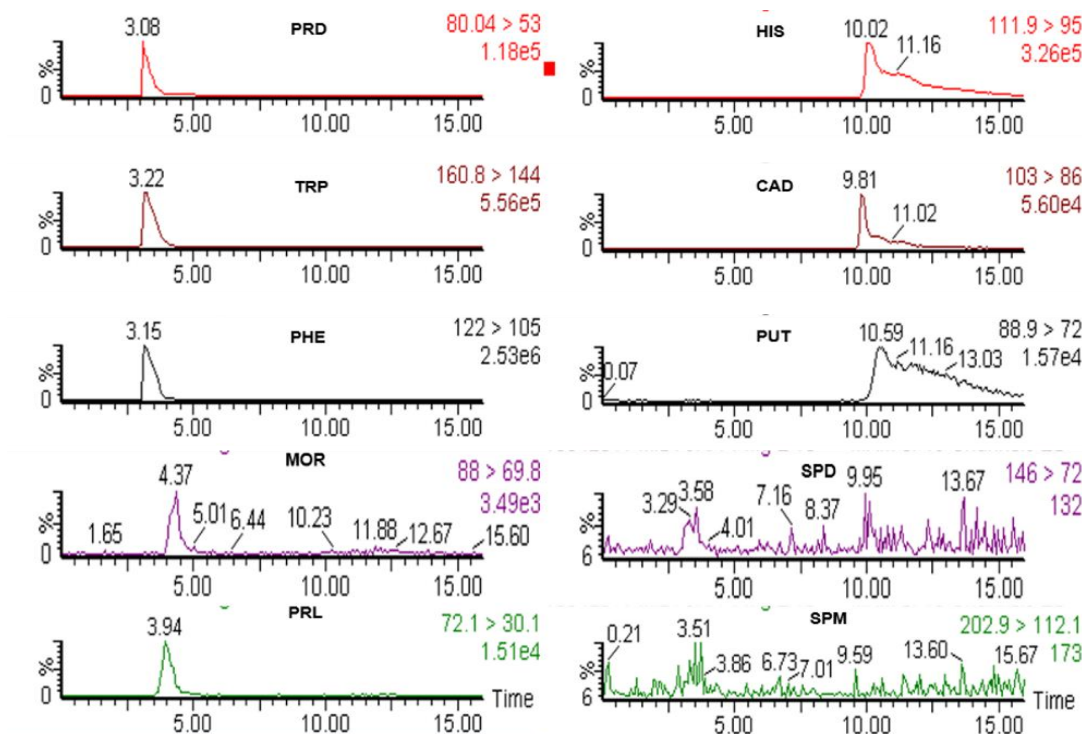


Figura 34: Cromatograma no modo SRM obtido empregando a condição de eluição 3 na coluna Luna HILIC

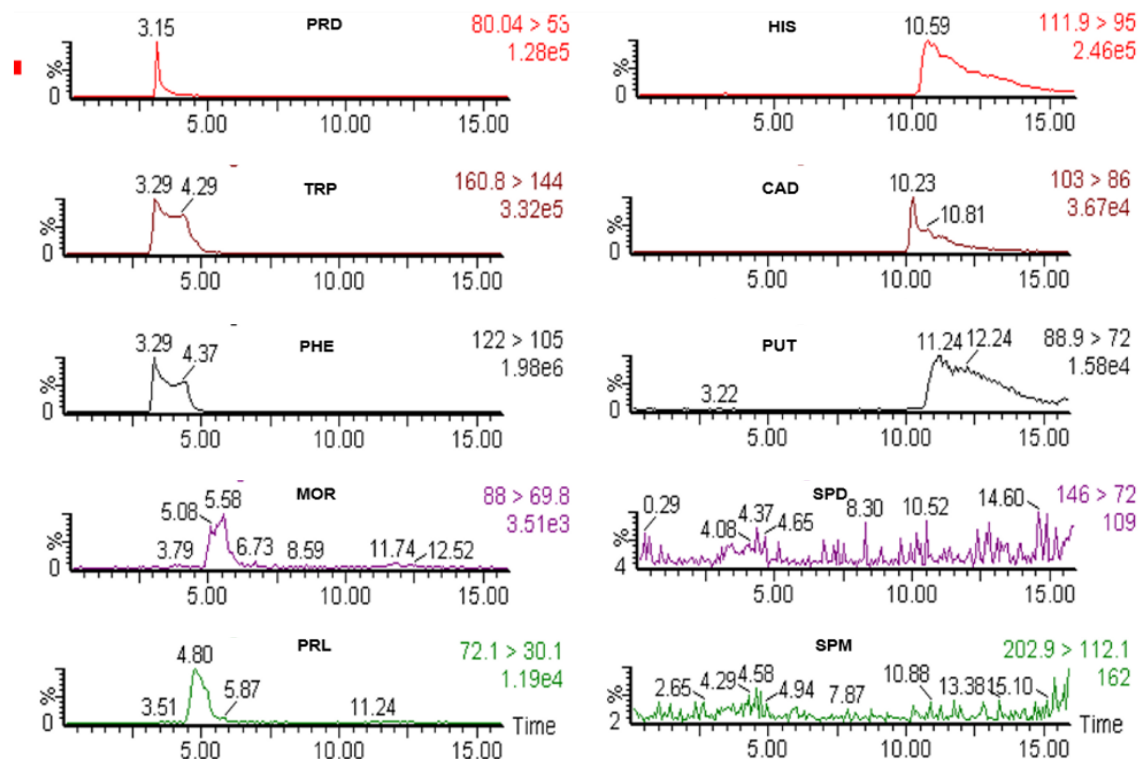


Figura 35: Cromatograma no modo SRM obtido empregando a condição de eluição 4 na coluna Luna HILIC

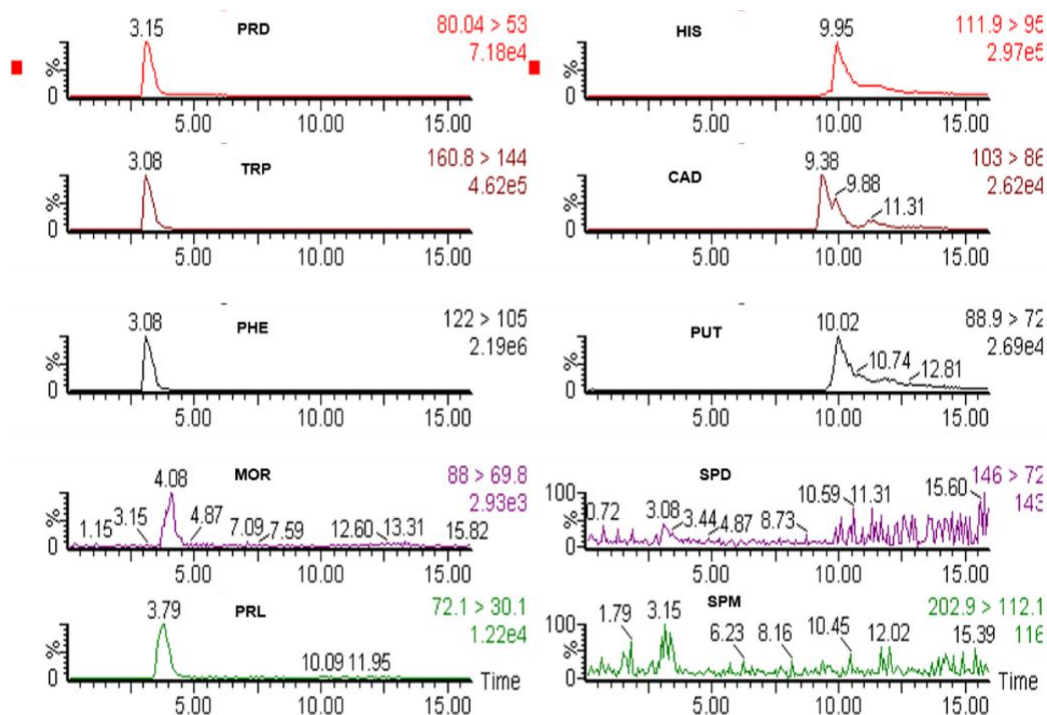
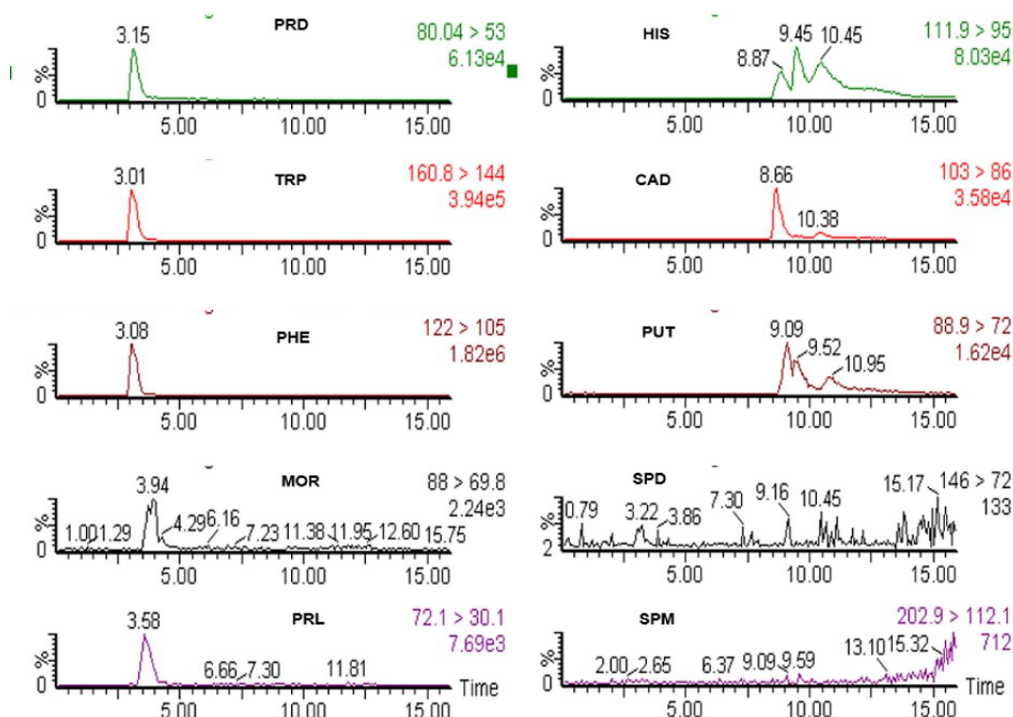


Figura 36: Cromatograma no modo SRM obtido empregando a condição de eluição 5 na coluna Luna HILIC



10.3. Condições de eluição empregadas para a coluna Atlantis HILIC

Tabela 34: Condição de eluição 1 empregada no modo gradiente para a coluna Atlantis HILIC

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA + 10mM AF	ACN com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	10	90	0,4
2	80	20	
5	80	20	
5,5	10	90	
10	10	90	

Tabela 35: Condição de eluição 2 empregada no modo gradiente para a coluna Atlantis HILIC

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA + 10mM AF	ACN com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	10	90	0,4
2	60	40	
10	80	20	
12	80	20	
13	10	90	
18	10	90	

Tabela 36: Condição de eluição 3 empregada no modo gradiente para a coluna Atlantis HILIC

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA + 10mM AF	ACN com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	10	90	0,4
10	70	30	
11	10	90	
16	10	90	

Tabela 37: Condição de eluição 4 empregada no modo gradiente para a coluna Atlantis HILIC

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA + 10mM AF	ACN com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	10	90	0,4
10	80	20	
11	10	90	
16	10	90	

Tabela 38: Condição de eluição 5 empregada no modo gradiente para a coluna Atlantis HILIC

tempo (min)	Água MillQ com 0,1% FA + 10mM AF	ACN com 0,1% FA	Vazão (mL min ⁻¹)
0	30	70	0,4
10	90	10	
12	100	0	
15	100	0	
16	30	70	
21	30	70	

Figura 37: Cromatograma no modo SRM obtido na condição de eluição 1 empregada na coluna Atlantis HILIC

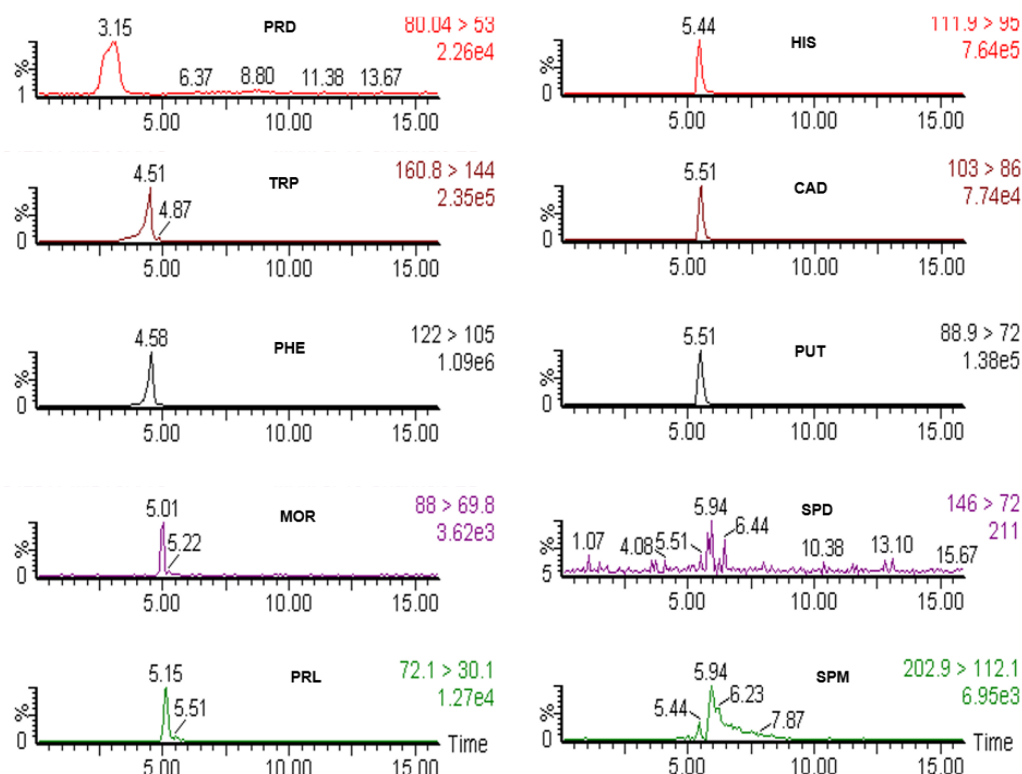


Figura 38: Cromatograma no modo SRM obtido na condição de eluição 2 empregada na coluna Atlantis HILIC

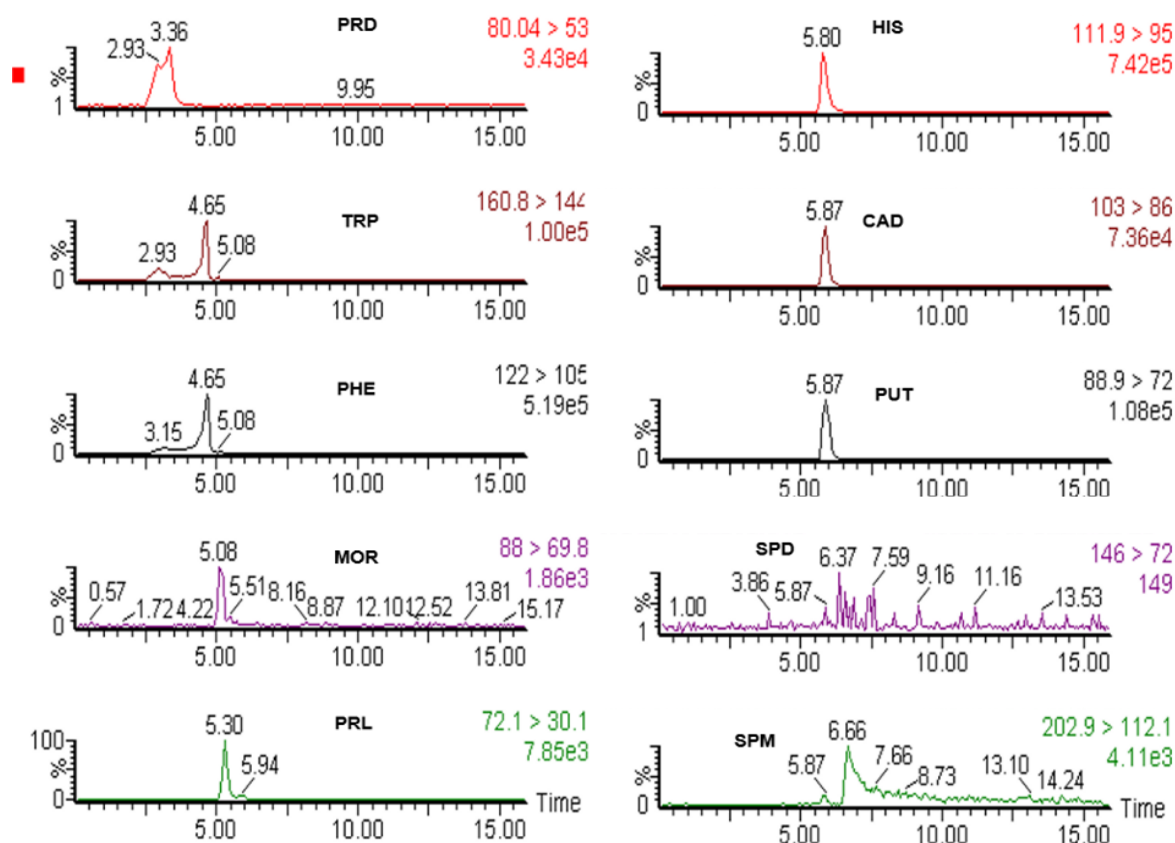


Figura 39: Cromatograma no modo SRM obtido na condição de eluição 3 empregada na coluna Atlantis HILIC

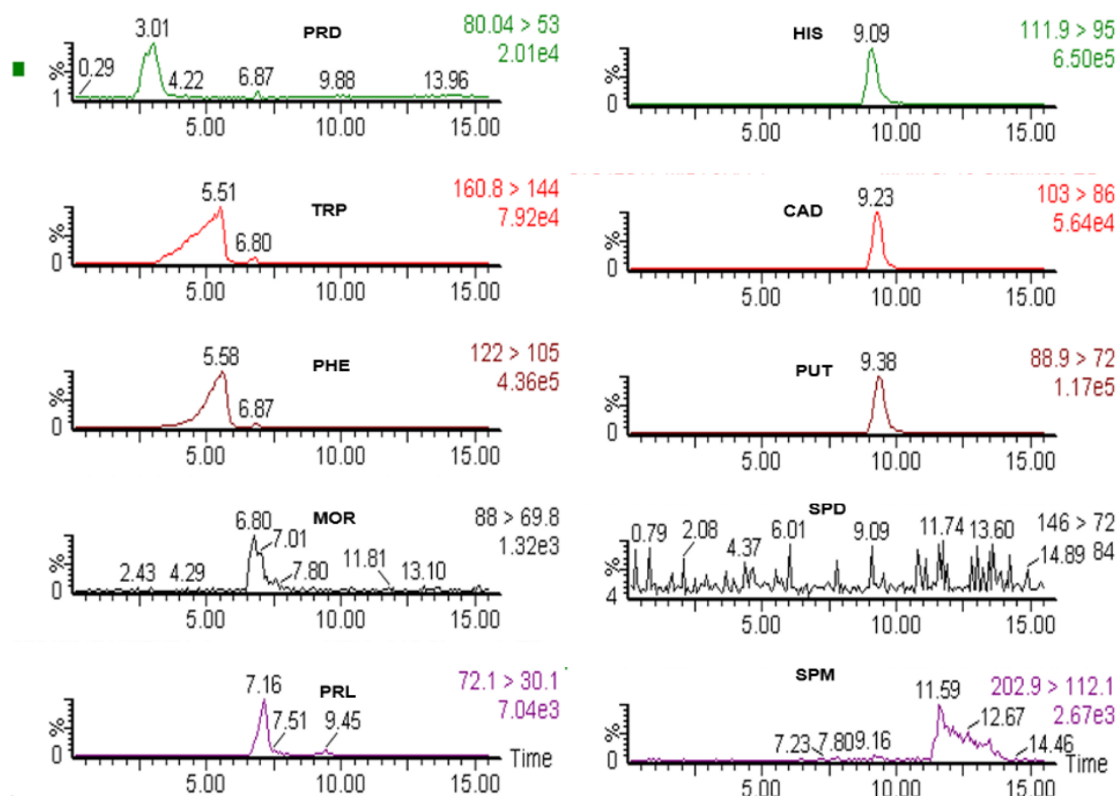


Figura 40: Cromatograma no modo SRM obtido na condição de eluição 4 empregada na coluna Atlantis HILIC

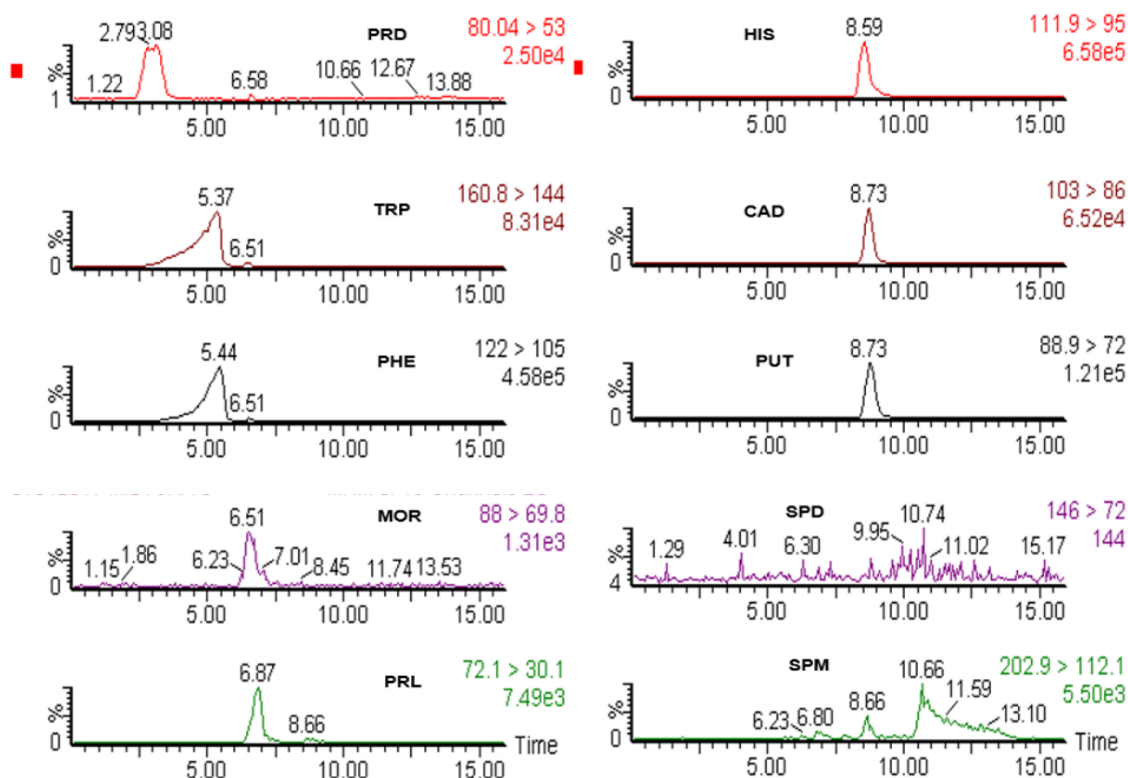


Figura 41: Cromatograma no modo SRM obtido na condição de eluição 5 empregada na coluna Atlantis HILIC

