

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Davyston Carvalho Pedersoli

**ELETROEXTRAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM LEITE E VINHO E
DETERMINAÇÃO POR PAPER SPRAY-MS E UHPLC-MS/MS**

Belo Horizonte
2022

UFMG/ICEX/DQ. 1.492
D. 812

Davyston Carvalho Pedersoli

**ELETROEXTRAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM LEITE E VINHO E
DETERMINAÇÃO POR PAPER SPRAY-MS E UHPLC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Ricardo Mathias Orlando

Coorientador: Clésia Cristina Nascentes

Belo Horizonte
2022

Ficha Catalográfica

P371e
2022
D

Pedersoli, Davyston Carvalho.

Eletroextração de aminas biogênicas em leite e vinho e determinação por paper spray-MS e UHPLC-MS/MS [manuscrito] / Davyston Carvalho Pedersoli. 2022.

119 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Ricardo Mathias Orlando.

Coorientadora: Clésia Cristina Nascentes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.

Bibliografia: f. 105-111.

Anexo: f. 112-119.

1. Química analítica – Teses. 2. Extração (Química) – Teses. 3. Aminas biogênicas – Teses. 4. Preparação de amostra (Química) – Teses. 5. Leite – Teses. 6. Vinho – Teses. 7. Espectrometria de massa – Teses. 8. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 9. Inovações tecnológicas – Teses. 10. Impressão - Equipamento e acessórios – Teses. 11. Imagem tridimensional – Teses. I. Orlando, Ricardo Mathias, Orientador. II. Nascentes, Clésia Cristina, Coorientadora. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

"Eletroextração de Aminas Biogênicas Em Leite e Vinho e Determinação Por Paper Spray-ms e Uhpilc-ms/ms"

Davyston Carvalho Pedersoli

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Ricardo Mathias Orlando - Orientador
UFMG

Profa. Clésia Cristina Nascentes - Coorientadora
UFMG

Profa. Letícia Malta Costa
UFMG

Prof. Bruno Gonçalves Botelho
UFMG

Belo Horizonte, 31 de março de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Mathias Orlando, Professor do Magistério Superior**, em 03/05/2022, às 22:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clesia Cristina Nascentes, Professora do Magistério Superior**, em 04/05/2022, às 07:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Leticia Malta Costa, Professora do Magistério Superior**, em 12/05/2022, às 15:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do



[Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Goncalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 13/05/2022, às 12:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1411755** e o código CRC **2D97D7D9**.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida.

Todo esse trabalho só se tornou possível pela ajuda e suporte que tive de algumas pessoas. Portanto só tenho a agradecer a todos que me apoiaram e me ajudaram durante este período.

Especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Orlando, agradeço a orientação exemplar nortada pelo elevado e rigoroso nível científico, pela visão crítica e oportuna, além do empenho inextinguível e saudavelmente exigente durante todos as etapas do trabalho aqui concretizado.

À minha coorientadora Profa. Dra. Clésia Nascentes pela orientação, paciência, incentivo e dedicação. E por todos os momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

Agradeço aos componentes da banca examinadora, Profa. Dra. Letícia Malta e o Prof. Dr. Bruno Botelho, por disporem de seu tempo e atenção para a avaliação deste trabalho. Em especial a Letícia que me acompanhou desde o início da minha graduação, por todos os ensinamentos, conselhos e bons momentos compartilhados.

Aos meus amados pais, Paulo Pedersoli e Lidia de Carvalho Pedersoli pelo carinho, apoio, ajuda e incentivos incondicional.

Aos meus queridos irmãos: Gladston, Fredston e Livyston pelo incentivo, amizade e carinho.

Ao meu cãopanheiro Harley Davyston, pela companhia e amor.

A minha namorada Ane Laura pelo amor, carinho, amizade, companheirismo, paciência e motivação, tanto na vida profissional quanto na vida pessoal.

À minha família como um todo, pelo amor, amizade e companheirismo.

Aos meus queridos amigos, por me proporcionarem diversos momentos de alegria e me incentivarem cada dia mais a ser uma pessoa melhor.

Aos amigos e colegas do laboratório LAMS e LEAQUAA, pessoas muito especiais que tornaram o ambiente de trabalho agradável durante todo o tempo. Pelos ensinamentos compartilhados, apoios e com vários momentos de risadas. Em especial a Denise, Milena, Luisa, Glauimar e Matheus, que me ajudaram diretamente na construção desse trabalho.

Aos professores do Departamento de Química que contribuíram para a minha formação ao longo dos anos.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de estudo e de me desenvolver profissionalmente.

Tudo posso naquele que me fortalece.

RESUMO

Aminas biogênicas (BA) são amplamente encontradas em alimentos e bebidas, o consumo desses compostos causa graves efeitos indesejáveis para a saúde humana. As BA estão presentes em muitos alimentos como leite e vinho, e uma alta concentração dessas aminas pode indicar uma má qualidade das matérias-primas, contaminação com microrganismos, processamento inadequado ou armazenamento. Infelizmente, a quantificação das BA ainda é problemática devido à sua baixa concentração em amostras de leite e vinho e, também, devido à complexidade da amostra com elevada polaridade, falta de cromóforos nas BA e presença de substâncias potencialmente interferentes com estruturas semelhantes. No presente trabalho, foi projetado um hardware em impressão 3D para o preparo de amostras e acoplamento ao equipamento analítico. Foi otimizado um método de eletroextração e análise por espectrometria de massa com ionização por paper spray (PS-MS), para a determinação de putrescina, cadaverina, histamina, triptamina, tiramina, feniletilamina, agmatina, espermidina e espermina em amostras de leite e vinho. Nas condições otimizadas o método se apresentou com seletividade e detectabilidade adequados (na faixa de concentração de ug/L). Em todas essas aplicações, a técnica mostrou-se eficiente em ionizar os analitos de interesse, destacando-se a sua capacidade em detectar substâncias diretamente pelo hardware desenvolvido, tendo baixo custo em relação às técnicas convencionais, simplicidade operacional, curto tempo de análises e se mostrando vantajosa para utilização nas rotinas analíticas laboratoriais.

Palavras-chave: Aminas biogênicas. Eletroextração. Impressão 3D. Paper spray. Leite.

ABSTRACT

Biogenic amines (BA) are widely found in foods and beverages, the consumption of these compounds causes serious undesirable effects on human health. BA are present in many foods such as milk and wine, and a high concentration of these amines can indicate poor quality of raw materials, contamination with microorganisms, improper processing or storage. Unfortunately, the quantification of BA is still problematic due to its low concentration in milk and wine samples and also due to the complexity of the sample with high polarity, lack of chromophores in BA and the presence of potentially interfering substances with similar structures. In the present work, a 3D printing hardware was designed for sample preparation and coupling to the analytical equipment. An electroextraction and analysis method by paper spray ionization mass spectrometry (PS-MS) was optimized for the determination of putrescine, cadaverine, histamine, tryptamine, tyramine, phenylethylamine, agmatine, spermidine and spermine in milk and wine samples. Under the optimized conditions, the method presented adequate selectivity and detectability (in the concentration range of ug/L). In all these applications, the technique proved to be efficient in ionizing the analytes of interest, highlighting its ability to detect substances directly by the developed hardware, low cost compared to conventional techniques, operational simplicity, short analysis time and proving to be advantageous for use in laboratory analytical routines.

Key-words: Biogenic amines. Electroextraction. 3D printing. Paper spray. Milk.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Vias metabólicas das aminas biogênicas. | 28 |
| Figura 2 - Representação simplificada de como funciona a técnica de paper spray (BARBOSA, 2021). | 41 |
| Figura 3 - Esquema de deposição de material por uma impressora 3D do tipo filamento ou FDM (Modelagem de Deposição Fundida)(Fonte: Prototest)..... | 43 |
| Figura 4 - Prototipagem com impressão 3D visando diferentes segmentos. a) Suporte de ácido polilático impresso em 3D. b) Micromisturadores impressos em 3D utilizando termoplástico PLA. c) Blocos de espumas de isolamento térmico à base de cortiça impressas em 3D. | 45 |
| Figura 5 - Esquema ilustrativo do dispositivo multipoços para eletroextração. Adaptado de Miranda 2020. | 49 |
| Figura 6 - Ilustração esquemática do tudo, papel e eletrodo para eletroextração..... | 51 |
| Figura 7 - a) Sistema completo de eletroextração. b) Hardware de eletroextração. c) Fonte para aplicação do potencial..... | 52 |
| Figura 8 - Modelos de papeis cromatográficos com formatos e espessura diferentes utilizados para ionização no PS-MS..... | 55 |
| Figura 9 - Reação de derivatização de aminas primárias e secundárias por ação do cloreto de dansila..... | 61 |
| Figura 10 - Gradiente de injeção usado para analisar as BA..... | 63 |
| Figura 11 - Teste de precipitação proteica em vinho tinto. b) Teste de precipitação proteica em vinho suave. c) Teste de precipitação proteica em leite integral UHT..... | 68 |
| Figura 12 - a) Primeira versão do dispositivo de eletroextração desenvolvido empregando somente o polímero PLA. b) Peças desmontadas do sistema de eletroextração desenvolvido empregando somente o polímero PLA. | 69 |
| Figura 13 - a) Segunda versão dispositivo para eletroextração desenvolvido empregando o polímero PLA (cinza) e PET-G (incolor). b) Peças desmontadas do sistema de eletroextração desenvolvido empregando o polímero PLA e PET-G. | 70 |
| Figura 14 - Dispositivo impresso em impressora 3D com polímero PLA para acoplar na entrada da fonte do espectrômetro de massas. | 71 |
| Figura 15 - a) Fonte antiga de ionização por paper spray. b) Espectrometria de massas com ionização por paper spray..... | 72 |
| Figura 16 - Dispositivo feito em PLA por impressão 3D para ionização por paper spray no espectrômetro de massas. | 73 |
| Figura 17 - Prova de conceito visual do sistema de eletroextração com corante azul de metileno. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 min; fase doadora composta por 7 mL mistura 1:1 (v/v) de acetonitrila em tampão McIlvaine pH 3: acetonitrila 1:1 (v/v); filtro orgânico composto por 5,25 de 1-octanol; fase aceptora constituída | |

| | |
|--|----|
| de papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 µL de ácido acético 400 mmol L ⁻¹ (n = 3)..... | 74 |
| Figura 18 - Íons precursores das BA protonadas obtidas no modo positivo por PS-MS..... | 76 |
| Figura 19 - a) Espectro referente à putrescina. b) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à putrescina. c) Espectro referente à cadaverina. d) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à cadaverina. e) Espectro referente à histamina. f) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à histamina. g) Espectro referente à feniletilamina. h) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à feniletilamina. i) Espectro referente à tiramina. j) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à tiramina. k) Espectro referente à espermidina. l) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à espermidina. m) Espectro referente à triptamina. n) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à triptamina. | 79 |
| Figura 20 - Influência do campo elétrico na eletroextração dos analitos da fase doadora para a fase aceptora. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 min; fase doadora composta por 7 mL mistura 1:1 (v/v) de acetonitrila em tampão McIlvaine pH 3: acetonitrila 1:1 (v/v); filtro orgânico com-posto por 5,25 de 1-octanol; fase aceptora constituída de papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 µL de ácido acético 400 mmol L ⁻¹ (n = 3)..... | 80 |
| Figura 21 – Comparação do papel cromatográfico em diferentes espessuras (1Chr e 3MM Chr) e em diferentes formatos. As condições de extração foram: diferença de potencial de 300 V aplicado durante 10 min; fase doadora composta por 8 mL de BA 1 mg.L ⁻¹ em tampão: ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico constituído de 4 mL de 1-octanol; fase aceptora composta por papel cromatográfico com 70 µL de HAc 400 mmol L ⁻¹ | 81 |
| Figura 22 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para potencial e o tempo na otimização dos parâmetros da eletroextração para a feniletilamina. | 84 |
| Figura 23 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para potencial e acetonitrila na otimização dos parâmetros da eletroextração para a feniletilamina. | 85 |
| Figura 24 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para tempo e acetonitrila na otimização dos parâmetros da eletroextração para a feniletilamina. | 86 |
| Figura 25 - Gráfico de Pareto para a feniletilamina. 1) Voltagem no papel. 2) Temperatura do capilar. 3) Voltagem do capilar. 4) Distância e temperatura do capilar. 5) Distância. 6) Distância e voltagem do capilar. 7) Distância e voltagem no papel. | 88 |
| Figura 26 - Comparação entre as matrizes de análise. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 min; fase doadora composta por 7 mL mistura 1:1 (v/v) de acetonitrila em tampão McIlvaine pH 3: acetonitrila 1:1 (v/v); filtro orgânico com-posto por 5,25 de 1-octanol; fase aceptora constituída de papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 µL de ácido acético 400 mmol L ⁻¹ (n = 3)..... | 90 |
| Figura 27 - Análise por PS-MS de 10 mg L ⁻¹ das aminas biogênicas. b) Análise por PS-MS do processo otimizado de derivatização com cloreto de dansila para as aminas biogênicas. | 91 |

| | |
|--|-----|
| Figura 28 - Processo de derivatização no papel utilizando uma câmara de luz IV. b) Processo de derivatização do papel utilizando uma estufa a 60°C. Os parâmetros de derivatização foram: pool de BA a 10 mg.L ⁻¹ ; o pH variou entre 8 e 9; o tempo ficou em 15, 30 e 60 minutos; a temperatura de trabalho foi de 45, 60 e 75 °C; e o meio de aquecimento foi utilizando uma estufa e uma câmara de infravermelho. | 92 |
| Figura 29 - Análise por PS-MS de 10 mg L ⁻¹ das aminas biogênicas. b) Análise por PS-MS do processo de derivatização na estufa com cloreto de dansila para as aminas biogênicas no papel. c) Análise por PS-MS do processo de derivatização na câmara de luz IV com cloreto de dansila para as aminas biogênicas em papel. | 93 |
| Figura 30 - Cromatogramas das 9 aminas biogênicas a 1 mgL ⁻¹ após a eletroextração. | 96 |
| Figura 31 - Resposta dos analitos a 1 mg.L ⁻¹ extraídos em diferentes soluções. | 97 |
| Figura 32 - Resposta da espermidina e espermina em função da variação da composição da solução de dessorção. As soluções de trabalho com suas proporções (v/v) são: ACN, H2O MeOH, H2O:Hac (95:5), MeOH:Hac (95:5), ACN:Hac (95:5), H2O:MeOH:Hac (47,5:47,5:5), H2O:ACN:Hac (47,5:47,5:5), MeOH:ACN:Hac (47,5:47,5:5), H2O:THF:Hac (47,5:47,5:5), MeOH:NH4Ac 50 Mm (50:50) e DMSO:H2O (50:50). | 98 |
| Figura 33 - Sinais das aminas biogênicas em amostras comerciais de vinho..... | 101 |
| Figura 34 - Sinal das aminas biogênicas em amostras comerciais de leite. | 102 |
| Figura 35 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para potencial e o tempo na otimização dos parâmetros da eletroextração para a triptamina..... | 114 |
| Figura 36 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para potencial e acetonitrila na otimização dos parâmetros da eletroextração para a triptamina. | 115 |
| Figura 37 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para acetonitrila e o tempo na otimização dos parâmetros da eletroextração para a triptamina. | 116 |
| Figura 38 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para potencial e o tempo na otimização dos parâmetros da eletroextração para a espermidina..... | 117 |
| Figura 39 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para potencial e acetonitrila na otimização dos parâmetros da eletroextração para a espermidina..... | 118 |
| Figura 40 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para acetonitrila e o tempo na otimização dos parâmetros da eletroextração para a espermidina..... | 119 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 - Funções das aminas biogênicas no corpo humano (DINIZ, 2015). | 25 |
| Tabela 2 - Estruturas e propriedades químicas das principais BA estudadas. (PUBCHEM, 2021)..... | 27 |
| Tabela 3 - Metodologias para determinação de aminas biogênicas nos últimos 5 anos, utilizando técnicas analíticas de separação..... | 30 |
| Tabela 4 - Metodologias que empregaram técnicas de eletroextração para determinação de diferentes analitos em leite e vinho..... | 32 |
| Tabela 5 - Metodologias que empregaram a técnica de PS-MS para determinação de diferentes analitos em leite e vinho..... | 33 |
| Tabela 6 - Revisão de metodologias para extração de aminas biogênicas..... | 37 |
| Tabela 7 - Metodologias que empregaram técnicas de eletroextração para determinação de aminas biogênicas em diferentes matrizes..... | 39 |
| Tabela 8 - Diferentes tecnologias de impressão 3D..... | 44 |
| Tabela 9 - Parâmetros de impressão para diferentes tipos de polímeros..... | 50 |
| Tabela 10 - Níveis e variáveis trabalhadas no planejamento de Box-Behnken..... | 56 |
| Tabela 11 - Valores das variáveis potencial elétrico (50, 175, 300 V), tempo (2, 10, 18 min) e percentual de solvente orgânico na fase doadora (0, 25, 50%) para os 13 experimentos do planejamento Box-Behnken..... | 57 |
| Tabela 12 - Condições experimentais para o planejamento fracionário..... | 59 |
| Tabela 13 - Estudo de experimentos para comparação das fases doadoras..... | 60 |
| Tabela 14 - Condições para otimização da derivatização..... | 62 |
| Tabela 15 - Condições UPLC-MS/MS para aminas biogênicas..... | 64 |
| Tabela 16 - Misturas de solventes de dessorção..... | 65 |
| Tabela 17 - Íons precursores das BA e os respectivos íons produto..... | 75 |
| Tabela 18 - Parâmetros da ANOVA para a Feniletilamina..... | 83 |
| Tabela 19 - Parâmetros da ANOVA para a feniletilamina..... | 88 |
| Tabela 20 - Parâmetros adotados para análise por PS-MS..... | 89 |
| Tabela 21 - Tempo de retenção para os analitos na cromatografia líquida..... | 99 |
| Tabela 22 - Limites de detecção para as aminas biogênicas em estudo..... | 100 |
| Tabela 23 - Parâmetros da ANOVA para a triptamina..... | 112 |
| Tabela 24 - Parâmetros da ANOVA para a espermidina..... | 113 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | | |
|----------|---|--|
| ABS | – | ACRILONITRILA BUTADIENO ESTIRENO |
| AGM | – | AGMATINA |
| BA | – | AMINAS BIOGÊNICAS |
| CAD | – | CADAVERINA |
| CE | – | COMISSÃO EUROPEIA |
| EE-PS-MS | – | ELETROEXTRAÇÃO E ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR <i>PAPER SPRAY</i> |
| EFSA | – | AUTORIDADE EUROPEIA DE SEGURANÇA ALIMENTAR |
| ESI | – | <i>ELETROSPRAY</i> |
| FDM | – | DEPOSIÇÃO DE FILAMENTO FUNDIDO |
| FIA | – | ANÁLISE DE INJEÇÃO DE FLUXO |
| GC | – | CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA |
| GC-MS | – | CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS |
| HIS | – | HISTAMINA |
| HPLC | – | CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA |
| IBA | – | ÍNDICE DE AMINAS BIOGÊNICAS |
| LC-MS | – | CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS |
| MS | – | ESPECTROMETRIA DE MASSAS |
| m/z | – | MASSA/CARGA |

| | | |
|-------|---|---|
| PEA | – | FENILETILAMINA |
| PLA | – | ÁCIDO POLILÁTICO |
| PNMQL | – | PROGRAMA NACIONAL DE MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE |
| PS-MS | – | ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR <i>PAPER SPRAY</i> |
| PUT | – | PUTRESCINA |
| RBQL | – | REDE BRASILEIRA DE LABORATÓRIOS CENTRALIZADOS DA QUALIDADE DE LEITE |
| SLA | – | ESTEREOLITOGRAFIA |
| SLM | – | DERRETIMENTO A LASER |
| SLS | – | SINTERIZAÇÃO A LASER |
| SPD | – | ESPERMIDINA |
| SPM | – | ESPERMINA |
| STL | – | <i>Stereolithography</i> |
| TPE | – | ELASTÔMERO TERMOPLÁSTICO |
| TRM | – | TIRAMINA |
| TRY | – | TRIPTAMINA |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 1.1 | OBJETIVO GERAL | 20 |
| 1.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| 2 | CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA | 22 |
| 2.1 | LEITE..... | 22 |
| 2.2 | VINHO | 23 |
| 2.3 | AMINAS BIOGÊNICAS | 24 |
| 2.4 | TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE BA..... | 29 |
| 2.5 | TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE BA..... | 35 |
| 2.6 | ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR <i>PAPER</i> <i>SPRAY</i> (PS-MS)..... | 40 |
| 2.7 | USO DA IMPRESSÃO 3D EM MÉTODOS ANALÍTICOS..... | 42 |
| 3 | PARTE EXPERIMENTAL (METODOLOGIA)..... | 47 |
| 3.1 | MATERIAIS E REAGENTES | 47 |
| 3.2 | EQUIPAMENTOS | 47 |
| 3.3 | PREPARO E ARMAZENAGEM DAS SOLUÇÕES ESTOQUES..... | 48 |
| 3.4 | MATRIZ DE ANÁLISE..... | 48 |
| 3.5 | DESENVOLVIMENTO DO HARDWARE DE ELETROEXTRAÇÃO (EE) UTILIZANDO UMA IMPRESSORA 3D..... | 49 |
| 3.6 | DESENVOLVIMENTO DO HARDWARE PARA ACOPLAR NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS UTILIZANDO UMA IMPRESSORA 3D..... | 50 |
| 3.7 | MONTAGEM DO SISTEMA DE ELETROEXTRAÇÃO..... | 51 |
| 3.8 | PROVA DE CONCEITO PARA A ELETROEXTRAÇÃO (EE) COM CORANTE | 53 |
| 3.9 | ANÁLISES POR PS-MS | 54 |
| 3.10 | ESTUDO UNIVARIADO DAS CONDIÇÕES QUE AFETAM A ELETROEXTRAÇÃO | 55 |
| 3.11 | PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN PARA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ELETROEXTRAÇÃO..... | 56 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.12 | OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO FRACIONADO 2 ⁴⁻¹ | 58 |
| 3.13 | COMPARAÇÃO ENTRE TAMPÃO, LEITE E VINHO COMO FASE DOADORA..... | 60 |
| 3.14 | DERIVATIZAÇÃO COM CLORETO DE DANSILA (DBS-CL) E IDENTIFICAÇÃO POR PS-MS | 61 |
| 3.15 | ANÁLISE POR UHPLC-MS/MS | 62 |
| 3.16 | AVALIAÇÃO DO TIPO E QUANTIDADE DE SOLVENTE NA PORCENTAGEM DE ANALITO DESSORVIDO | 65 |
| 3.17 | VALIDAÇÃO QUALITATIVA DO MÉTODO..... | 66 |
| 3.18 | DETERMINAÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE LEITE E VINHO | 66 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 67 |
| 4.1 | MATRIZ DE ANÁLISE..... | 67 |
| 4.2 | DESENVOLVIMENTO DO <i>HARDWARE</i> DE ELETROEXTRAÇÃO (EE) UTILIZANDO UMA IMPRESSORA 3D..... | 68 |
| 4.3 | DESENVOLVIMENTO DO <i>HARDWARE</i> PARA ACOPLAR NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS UTILIZANDO UMA IMPRESSORA 3D..... | 71 |
| 4.4 | PROVA DE CONCEITO PARA A ELETROEXTRAÇÃO (EE) COM CORANTE | 73 |
| 4.5 | TRIAGEM DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS..... | 74 |
| 4.6 | ESTUDO UNIVARIADO DAS CONDIÇÕES QUE AFETAM A ELETROEXTRAÇÃO | 80 |
| 4.7 | PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN PARA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ELETROEXTRAÇÃO..... | 82 |
| 4.8 | OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2 ⁴⁻¹ | 87 |
| 4.9 | COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS FORTIFICADAS DE SOLUÇÃO TAMPÃO, LEITE E VINHO COMO FASE DOADORA | 89 |
| 4.10 | DERIVATIZAÇÃO COM CLORETO DE DANSILA (DBS-CL) E IDENTIFICAÇÃO POR PS-MS | 90 |
| 4.11 | ANÁLISE POR UHPLC-MS/MS | 94 |
| 4.12 | AVALIAÇÃO DO TIPO E QUANTIDADE DE SOLVENTE NA PORCENTAGEM DE ANALITO DESSORVIDO | 97 |
| 4.13 | VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUALITATIVO | 98 |

| | | |
|---------------|---|------------|
| 4.13.1 | Seletividade | 98 |
| 4.13.2 | Limite de detecção | 99 |
| 4.14 | ANÁLISES DE AMOSTRAS COMERCIAIS | 100 |
| 5 | CONCLUSÕES | 104 |
| | REFERÊNCIAS | 105 |
| | ANEXO A | 112 |
| 6.1 | PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN PARA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ELETROEXTRAÇÃO | 112 |

1 INTRODUÇÃO

O leite é mundialmente apreciado pelas suas qualidades gastronômicas e nutricionais, com uma produção de grande relevância para o agronegócio brasileiro. Trata-se de uma das cadeias produtivas mais complexas, pois está vinculada com uma série de insumos e serviços sem os quais a atividade produtiva não ocorreria. Desde a alimentação do gado até à logística de transporte destinada à indústria ou ao seu beneficiamento. (BACCHI, 2019)

Dos insumos relacionados à essa cadeia estão, os produtos veterinários, o melhoramento genético, rações, alimentos para o gado, fertilizantes, a ordenha e a refrigeração. Logo um leite de maior qualidade está ligado diretamente à qualidade dos insumos utilizados nessa cadeia. (BACCHI, 2019) Para atender o anseio de uma sociedade cada vez mais preocupada com a qualidade dos produtos que consome, assim como exigências internacionais, a Rede Brasileira de Laboratórios Centralizados da Qualidade de Leite (RBQL) através do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, aprovou a Instrução Normativa nº 51 - IN51, contendo os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite. (SANTOS, 2016)

Outra bebida muito consumida no Brasil é o vinho, sendo a terceira bebida alcoólica com maior consumo per capita no país, perdendo apenas para a cerveja. Os vinhos brasileiros são produzidos a partir de variedades de uvas finas, das espécies *Vitis vinifera*, e por variedades de uvas americanas ou híbridas, principalmente das espécies *Vitis labrusca* (BRAGA, 2015). Vinhos produzidos exclusivamente por uvas *V. viniferas* são legalmente denominados de vinhos finos e aqueles em que uvas americanas e/ou híbridas predominam em sua elaboração são denominados vinhos de mesa (BRASIL, 2014).

Em todo o mundo vem se tendo uma tendência de redução de consumo de vinhos em termos quantitativos e um aumento pelo consumo de vinhos finos, reforçando a necessidade de se produzir vinhos de melhor qualidade. (COLIMO, 2013)

Um dos critérios que determina a qualidade de leite e vinhos são as substâncias químicas em sua composição, sobretudo aqueles cujas concentrações máximas são definidas pela legislação (MAPA, ANVISA E OIV). Dentre essas substâncias temos as aminas biogênicas (BA), os teores dessas aminas devem ser controlados já que em excesso esses elementos causam preocupação devido a sua toxicidade para os consumidores dessas bebidas. (COLIMO, 2013)

As aminas biogênicas são compostos naturalmente presentes nos alimentos. Nos últimos anos ganharam um enfoque especial, pois passaram a ser associadas à saúde e também a algumas patologias. (Huang et al., 2019) As BA são os compostos nitrogenados mais simples presentes no leite e no vinho, definidas como moléculas de baixa massa molar associadas ao grupo amino. São sintetizadas principalmente pela descarboxilação de aminoácidos pelos metabolismos microbiano, vegetal e animal. (COLIMO, 2013)

Apesar disso, as BA possuem várias contribuições nos seres humanos. As poliaminas, além de atuarem no crescimento e metabolismo celular, apresentam efeito antioxidante, inibindo a oxidação lipídica, são importantes na maturação e recuperação da mucosa intestinal, mediam a ação de hormônios e fatores de crescimento, estando envolvidas na síntese de DNA, RNA e proteínas. (DINIZ, 2015)

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para determinar os níveis de BA em diferentes alimentos, alguns destes métodos são baseados em análises colorimétricas e fluorométricas focadas principalmente na determinação individual da histamina. Comercialmente estão disponíveis kits rápidos baseados no imunoenensaio para detectar histamina em peixes. Existem também métodos que permitem a determinação simultânea de várias BA usando técnicas cromatográficas como: cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chama (CG-FID) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (HPLC-MS), análise de injeção de fluxo (FIA), eletroforese capilar, dentre outros. (HUANG et al., 2019).

De todos esses métodos, o HPLC empregando detectores de fluorescência é o mais popular e frequentemente relatado para a separação e quantificação de BA, sendo o método analítico recomendado pela Comissão Europeia (CE).

Infelizmente, a quantificação de BA ainda é problemático devido à sua baixa concentração em amostras de leite e vinho, e também, devido à complexidade da amostra, falta de cromóforos nas moléculas de BA e presença de substâncias potencialmente interferentes com estruturas semelhantes. Não obstante, o HPLC com detector de fluorescência é, de longe, a técnica mais relatada para a determinação desses compostos em amostras de leite e vinho, no entanto, existe a dificuldade em desenvolver um método de derivatização que reside na escolha do reagente adequado, o qual atenda às exigências dos seguintes critérios: método de análise, seletividade, compatibilidade com as condições de reação necessárias e possibilidade de trabalhar no modo de pré-coluna, tornando assim uma técnica complexa (JASTRZEBSKA et al., 2016).

1.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um método para determinação de aminas biogênicas em amostras de leite e vinho após etapa de preparo de amostras por eletroextração e posterior determinação por PS-MS e UHPLC-MS/MS.

1.2 Objetivos específicos

Desenvolver um método de eletroextração (EE) para aminas biogênicas em amostras de leite e vinho.

Desenvolver o método de análise por espectrometria de massas com ionização por PS-MS para identificação e um método por UHPLC-MS/MS para confirmação.

Desenvolver o método de eletroextração - *paper spray* (EE-PS-MS) para a histamina, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, espermina, espermidina e agmatina.

Identificar as Aminas Biogênicas pelo método EE-PS-MS e por um método de referência (i.e LC-MS).

Aplicar o método em amostras de leite e vinho comerciais.

2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leite

O leite é um dos alimentos mais consumidos no Brasil e no mundo, tendo grande contribuição nutricional principalmente em períodos de crescimento humano. O Brasil é considerado um dos maiores produtores do mundo, produzindo cerca de 34,5 bilhões de litros de leite ao ano. (EMBRAPA, 2020) A produção de leite no mundo é de aproximadamente 850 milhões de toneladas de leite sendo o Brasil detentor de 5,59% dessa produção. (IFCN, 2019)

O leite é um dos alimentos mais tradicionais e muito utilizado como matéria-prima para a produção de alimentos derivados na indústria de laticínios. Várias classes de antibióticos são frequentemente utilizadas como aditivos alimentares para promover o crescimento dos animais, ou a adição de bactérias probióticas ao leite com o intuito de agregar valor com relação a seus potenciais benefícios funcionais. (COSTA et al., 2015)

Já bem estabelecido no mercado, o uso de culturas mistas como *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, são utilizadas com sucesso em produtos lácteos. Durante os primeiros 10 dias de armazenamento, as linhagens probióticas são altamente viáveis em leites fermentados. Nesta fase, os probióticos produzem substâncias que podem fornecer efeitos benéficos à saúde humana. (ZHANG et al., 2019) No entanto, outros tipos de metabólitos, como as aminas biogênicas, também podem ser produzidos por cepas probióticas durante esse período. (Costa et al., 2015)

O leite possui uma grande variedade de nutrientes essenciais à saúde, como vitaminas, minerais e proteínas, ademais, o leite contém substâncias bioativas capazes de transmitir mensagens bioquímicas com implicações significantes para a saúde. (SANTOS, 2003)

Estudos de LÖSER (2000) demonstraram a presença de aminas biogênicas (BA) predominantes como espermina (17%), espermidina (15%) e agmatina (3%).

Observou-se também que a concentração das poliaminas sofreu variações devido a alguns fatores, como: idade do animal, período de lactação, estado nutricional, fatores genéticos, fatores ambientais e contaminação bacteriana. (DE FATIMA SILVA, 2008)

Produtos lácteos fermentados e em especial queijos, pertencem às fontes mais comuns de BA, principalmente a histamina, tiramina, putrescina e cadaverina. No geral, os teores de amins presentes no leite e nos derivados são baixos, exceto para os queijos que possuem altos níveis. (DONTHUAN et al, 2014)

2.2 Vinho

Outra atividade muito comum em pequenas propriedades no Brasil é a viticultura. No Brasil, o consumo de vinhos é de cerca de 1,93 litros per capita por ano, sendo baixo se comparado com os países do Mercosul e menor ainda se comparados com os países europeus tradicionais na produção de vinhos (MAPA, 2018). Atualmente, há uma tendência mundial de redução de consumo de vinhos em termos quantitativos e um aumento pelo consumo de vinhos finos. Isso reforça a necessidade de se produzir vinhos nacionais de melhor qualidade que consigam competir com os vinhos importados.

De acordo com a legislação brasileira, o vinho é a bebida obtida da fermentação alcoólica do mosto simples da uva sã, fresca e madura (MAPA, 2018). Os vinhos elaborados a partir de variedades de uvas americanas são denominados de mesa (ou comuns), por outro lado, vinhos denominados finos são aqueles elaborados com uvas das variedades *Vitis Vinifera*. Quanto à sua cor, os vinhos são classificados como tintos, brancos ou rosados (BRASIL, 2004). Por ser resultante da fermentação natural da uva, o vinho tem a sua qualidade influenciada diretamente pelo solo, clima, matéria-prima (uva) e pela tecnologia do processo de vinificação. (DOEUN et al., 2017)

Nos vinhos as BA comumente encontradas são a histamina, tiramina, triptamina e feniletilamina. São formadas pela descarboxilação de aminoácidos com enzimas específicas de substratos de leveduras ou bactérias deterioradoras, como

Lactobacillus, *Pediococcus* e *Leuconostoc*, e pela aminação e, ou, transaminação de aldeídos e cetonas. (HU et al., 2014) Essas aminas são provenientes da matéria-prima ou de processos de fermentação, ou envelhecimento ou armazenamento quando o vinho é exposto a atividade de microrganismos positivos para descarboxilase. (JASTRZEBSKA et al., 2016)

Estudos recentes demonstraram que a interação entre etanol (um inibidor da monoamina oxidase) e aminas, parece ser sinérgico. Isso é importante para os consumidores de vinho que são sensíveis a essas BA. Devido a esses problemas, alguns países europeus (Suíça, Áustria, Alemanha, Holanda, Bélgica e França) estabeleceram limites para histamina em vinho variando de 2 a 10 mg L⁻¹ (PALOMINO-VASCO et al., 2019), mas ainda é esperado que a União Europeia forneça um quadro regulamentar para as aminas biogénicas. Nesse sentido, a European Food Safety Authority (EFSA) lançou um documento sobre avaliação de risco de BA em alimentos, confirmando que a histamina e a tiramina são consideradas as mais tóxicas e particularmente relevantes para a segurança alimentar. (TUBEROSO et al., 2015)

2.3 Aminas biogénicas

Aminas biogénicas são amplamente encontradas em alimentos e bebidas, formadas principalmente pela descarboxilação de aminoácidos ou pela aminação ou transaminação de aldeídos e cetonas (Valente et al., 2012). As BA são bases orgânicas com estrutura alifática (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromáticas (feniletilamina e tiramina) e heterocíclicas (histamina e triptamina). Considerando a via biossintética, as aminas podem ser classificadas em biogénicas, quando são formadas pela descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas (histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina), e naturais, cuja formação ocorre *in situ* nas células à medida que são requeridas (putrescina, agmatina, espermina, espermidina e histamina). (DOEUN et al., 2017).

Com base no modo de ação, as BA podem ser classificadas como aminas vasoativas ou psicoativas. Aminas psicoativas atuam nos transmissores nervosos do sistema nervoso central, enquanto que, aminas vasoativas atuam direta ou indiretamente sobre o sistema vascular. A histamina, a putrescina e a cadaverina são aminas psicoativas, enquanto que, a tiramina, a triptamina e a feniletilamina são exemplos de aminas vasoativas (CARDOZO et al., 2013). As BA possuem naturalmente funções metabólicas representados na Tabela 1.

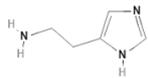
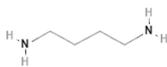
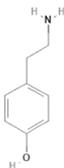
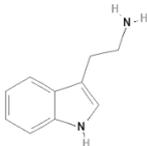
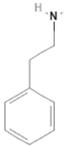
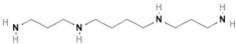
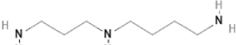
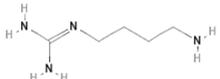
Tabela 1 - Funções das aminas biogênicas no corpo humano (DINIZ, 2015).

| Aminas biogênicas | Funções |
|--------------------------|--|
| Espermidina | Metabolismo, crescimento e diferenciação celular. |
| Espermina | Regulação e estimulação da síntese de DNA, RNA e proteínas. |
| Putrescina | Manutenção da alta atividade metabólica para um funcionamento saudável do intestino. |
| Cadaverina | Protetção celular contra o estresse oxidativo. |
| Histamina | Recicladores de radicais livres. |
| Tiramina | Deterioração de alimentos. |
| Triptamina | Estimulação dos neurônios sensoriais e motores. |
| Feniletilamina | Liberação de adrenalina e noradrenalina. |
| Agmatina | Aumento da pressão sanguínea. |
| | Vasoconstritor. |
| | Modula a função comportamental. |
| | Tem efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores. |

Porém, a ingestão desses compostos em altas concentrações pode causar graves efeitos toxicológicos indesejáveis para a saúde humana. No caso de intoxicação por histamina, os sintomas mais comuns entre os pacientes são: náusea, diarreia, erupção cutânea, dificuldade respiratória, hipotensão, hipertensão, dor de cabeça e enxaqueca (RAMON-MARQUEZ et al., 2016). Vale ressaltar que a presença de algumas poliaminas, principalmente cadaverina ou putrescina, podem aumentar a toxicidade da histamina e da tiramina. Além disso, poliaminas como cadaverina, putrescina, espermina e espermidina, ao reagir com nitrito dentro do sistema estomacal, pode levar à formação de nitrosaminas, que são compostos cancerígenos (NALAZEK-RUDNICKA & WASIK, 2017).

As BA estão presentes em muitos alimentos e bebidas, como leite, queijo, carnes, soja, peixe, frutas, vinho, cerveja, dentre outros. Histamina, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, espermina, espermidina, agmatina, são as aminas biogênicas mais importantes que encontramos nos alimentos. (Donthuan et al., 2014). Porém, a sua formação nos alimentos está condicionada à disponibilidade de aminoácidos livres e à presença de microrganismos descarboxilase positivos. (DANIEL et al., 2015). As estruturas e propriedades das aminas biogênicas estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Estruturas e propriedades químicas das principais BA estudadas. (PUBCHEM, 2021)

| Composto | Fórmula Molecular | Estrutura | Massa Molar (g mol ⁻¹) | Solubilidade a 20 °C (µg mL ⁻¹) | Coefficiente de partição octanol/água (log P) |
|----------------|--|---|------------------------------------|---|---|
| Histamina | C ₅ H ₉ N ₃ |  | 111,15 | 14,1 | -0,70 |
| Putrescina | C ₄ H ₁₂ N ₂ |  | 88,15 | 1,0 x 10 ⁹ | -0,70 |
| Cadaverina | C ₅ H ₁₄ N ₂ |  | 102,18 | 1,0 x 10 ⁹ | -0,16 |
| Tiramina | C ₈ H ₁₁ NO |  | 137,18 | 10,4 x 10 ⁶ | 0,72 |
| Triptamina | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ |  | 160,22 | 1,0 x 10 ⁶ | 1,55 |
| Feniletilamina | C ₈ H ₁₁ N |  | 121,18 | 7,5 x 10 ⁴ | 1,41 |
| Espermina | C ₁₀ H ₂₆ N ₄ |  | 202,34 | 100,0 | -0,70 |
| Espermidina | C ₇ H ₁₉ N ₃ |  | 145,25 | 32,7 x 10 ³ | -0,62 |
| Agmatina | C ₅ H ₁₄ N ₄ |  | 130,19 | 3,6 x 10 ³ | -1,20 |

A maioria das aminas é denominada a partir do seu aminoácido precursor. A histamina é originada a partir da histidina, a tiramina da tirosina, e assim por diante. No entanto, os nomes cadaverina e putrescina estão associados com os processos de decomposição e putrefação, e a espermidina e espermina, com fluidos seminais,

onde foram encontradas pela primeira vez. A via metabólica está representada na Figura 1.

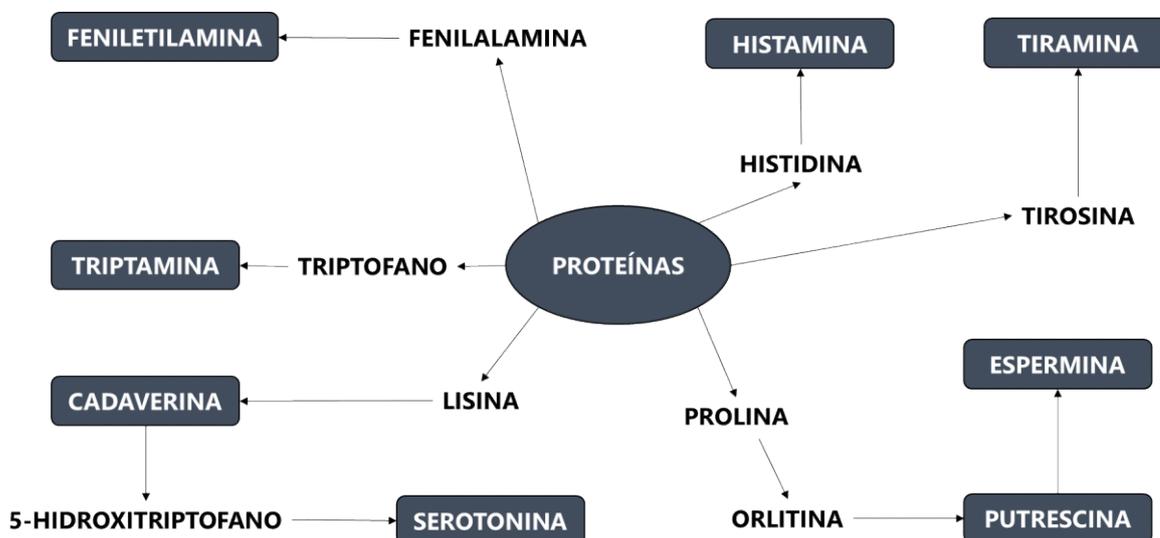


Figura 1 - Vias metabólicas das aminas biogênicas.

O consumo de alimentos que contenham grandes quantidades dessas BA pode ter sérias consequências toxicológicas. Os limites máximos toleráveis ainda não foram estabelecidos para várias BA, pois depende do tipo de alimento consumido. Entretanto, foram estabelecidos limites máximos para a histamina, que é uma das mais importantes em termos de efeitos toxicológicos (RAMON-MARQUEZ et al., 2016). A Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos estabeleceu 50 mg kg^{-1} como o nível tolerável de histamina para saúde humana, e considerou que níveis superiores a 500 mg kg^{-1} podem causar sérios problemas de saúde. Pela União Europeia (UE) e pela Comissão do Codex Alimentarius (CAC), 200 mg/kg de histamina é o sugerido como um nível seguro para evitar riscos à saúde. Para outras aminas biogênicas, tais como putrescina, cadaverina, agmatina, ainda não há um limite máximo estabelecido (DANIEL et al., 2015).

2.4 Técnicas analíticas para determinação de BA

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para determinar os níveis de BA em diferentes alimentos, alguns destes métodos são baseados em análises colorimétricas e fluorométricas focadas principalmente na determinação individual da histamina. Comercialmente estão disponíveis kits rápidos baseados em imunoenensaio para detectar histamina em peixes. Existem ainda métodos que permitem a determinação simultânea de várias BA usando técnicas cromatográficas como: cromatografia em fase gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS), análise por injeção de fluxo (FIA), eletroforese capilar, dentre outros. (Huang et al., 2019). De todos esses métodos, o HPLC empregando detectores de fluorescência é o mais popular e frequentemente relatado para a separação e quantificação de BA, sendo o método analítico recomendado pela Comissão Europeia (CE). Este procedimento oferece sensibilidade e seletividades adequados para esses compostos. Além disso, oferece a vantagem de analisar vários BA simultaneamente (BOTELHO, 2009).

Um levantamento de metodologias para determinação de aminas biogênicas nos últimos 5 anos, utilizando técnicas analíticas de separação, está representado na Tabela 3. Podemos observar que a técnica predominantemente utilizada é a da cromatografia líquida, já o preparo de amostras varia muito, porém podemos destacar a utilização da extração em fase sólida e extração sólido líquido, que são muito eficientes e tradicionais no mercado. As matrizes mais analisadas para aminas biogênicas foram cerveja, vinho e peixe. Foram encontradas também algumas publicações a respeito da eletroextração em membrana contemplando as matrizes leite e vinho, como apresentado na Tabela 4. Nela foi possível tirar parâmetros iniciais como o tipo do filtro orgânico, pH de trabalho, tipo de fase aceptora, além de qual o potencial elétrico aplicado e o tempo de preparo.

Na Tabela 5, apresentamos os parâmetros utilizados em análise de leite e vinho por *paper spray*. Não foram encontradas publicações com análise de aminas biogênicas por PS-MS, o que indica o potencial de inovação deste projeto.

Tabela 3 - Metodologias para determinação de aminas biogênicas nos últimos 5 anos, utilizando técnicas analíticas de separação.

| Técnica | Analito | Preparo de amostra | Derivatização | Faixa Linear (mg L ⁻¹) | LD (mg L ⁻¹) | LQ (mg L ⁻¹) | Matriz | Ref |
|-------------|--|---|---------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| HPLC-UV | HIS, TRM, PUT, CAD, SPD | Sistema de microfluidos (CEME) | Cloreto de dansila | 0,001-2,4 | 3000-8000 | 10000-25000 | Linguiça | ZARGHAMPOUR, 2018 |
| HPLC-MS/MS | TRM, CAD, PUT, SPD, SPM, TYR, HIS, AGM | Diluição e filtração | Cloreto de tosil | 0,002-44 | 0,00002-0,83 | 0,0008-0,27 | Cerveja e vinho caseiro (saborizado) | NALAZEK-RUDNICKA, 2017 |
| UHPLC-MS/MS | PUT, HIS, TYR, AGM, PUT, TRM, CAD, PEA | Descarbonatar Filtração | DEEMM | 0,13-240 | 0,03-0,63 | <0,1-1,3 | Cerveja | REDRUELLO, 2017 |
| HPLC-UV | PUT, CAD, TRM, PEA, SPD, SPD, HIS | Extração em fase sólida dispersiva (DSPE) | Cloreto de benzoílo | 0,25-20 | 0,133-0,509 | 0,331-1,54 | Vinho tinto, branco e do porto | MILHEIRO, 2019 |
| HPLC-DAD | TYR, PUT, CAD, SPD, HIS | PP LLE | Cloreto de benzoilo | N.I. | 0,03-1,3 | 0,2-5,0 | Leite fermentado de vaca e cabra | COSTA, 2015 |
| UHPLC-FD | PUT, AGM, CAD, HIS, TYR, TRM, PEA | N.I. | O-ftaldialdeído | 0,03-0,1 | 0,007-0,21 | 0,022-0,681 | Vinho e cerveja | PALOMINO-VASCO, 2019 |
| HPLC-MS/MS | CAD, HIS, PEA, PUT, SPD, SPD, TYR, TRM | SPE | Cloreto de dansila | 0,05-1 | 0,02-0,25 | 0,07-0,75 | Peixe | SAGRATINI, 2012 |

| | | | | | | | | |
|--------------------------------------|--|---------------------------|---|----------------|----------------|----------------|--|-------------------|
| HPLC-UV | PEA, HIS, TYR, SPD, SPD | MIL-DLLME | Cloreto de dansila | 0,01-1,0 | 0,001-0,004 | 0,004-0,01 | Vinho e peixe | CAO, 2019 |
| Cromatografia eletrocínética micelar | TYR, TRM | Precipitação e filtração | N.I. | 0,55 e 10,0 µm | 0,11 a 0,61 µm | 0,38 a 2,03 µm | Vinho branco, vinho de arroz e cerveja | HUANG, 2019 |
| RP-HPLC-UV | HIS | SLE | N.I. | 1-32 | 1 | 3 | Peixe | NADEEM, 2019 |
| HPLC-MS/MS | CAD, HIS, PEA, PUT, TRM, TYR, SPD, SPD | SPE | N.I. | 0,1-12,5 | 0,01-0,02 | 0,04-0,07 | Peixe | OCHI, 2019 |
| HPLC-UV-DAD | HIS | SLE | Cloreto de dansila | 0-720 | 10 | 3 | Peixe | ALTIERI, 2016 |
| RP-HPLC-UV | HIS, TRM, TYR, PEA | LLE | 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluorometil) benzeno | 0,04-0,58 | 0,06-0,01 | 0,02-0,03 | Vinho | JASTRZEBSKA, 2016 |
| HPLC-FLD | AGM, TRM, PEA, CAD, HIS, TYR, SPD, SPM | N.I. | Cloreto de dansila | 0,01-7,2 | 0,01-0,05 | 0,01-0,18 | Vinho | TUBEROSO, 2015 |
| CE-MS/MS | SPD, SPD, PUT, CAD, HIS, PEA, TRM, TYR | <i>Clean-up</i> Filtração | N.I. | N.I. | 0,001-0,002 | 0,003-0,008 | Cerveja e vinho | DANIEL, 2015 |
| GC-MS | TYR, HIS, PUT, CAD | µDLLME EME | N.I. | 0,001-1,0 | 0,0003-0,0011 | N.I. | Peixe enlatado | KAMANKESH, 2019 |

N.I. = Não informado.

Tabela 4 - Metodologias que empregaram técnicas de eletroextração para determinação de diferentes analitos em leite e vinho.

| Analito | Matriz | Fase doadora | Filtro orgânico | Fase aceptora | Potencial (V) | Tempo (min) | Técnica de análise | Ref. |
|---|---------------|---------------------|---|---------------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------|-----------------|
| Histidina, fenilalanina e triptofano | Leite | N.I. | NPOE, 10% de TEHP e 5% de DEHP | 100 mmol L ⁻¹ de HCl | 100 | 20 | HPLC | REZAZADEH, 2013 |
| pseudoefedrina (PSE), lidocaína (LID), propranolol (PRO) | Leite Materno | pH 4,0 | Gel de poliacrilamida pH 1,5 | pH 7,0 | 85 | 28 | HPLC-UV | ASADI, 2018 |
| Citalopram (CIT), desipramina (DESI), clozafina (CLZ), trimipramina (TRP) | Leite materno | pH 7,0 | Gel de agarose pH 5,0 | pH 5,0 | 30 | 30 | GC-FID | BEHPOUR, 2020 |
| Ampicilina | Leite | pH 6 | 1-octanol com nanopartículas de prata e óxido de grafeno reduzido | pH 4 | 30 | 10 | HPLC | AGHAEI, 2019 |

N.I. = Não informado.

Tabela 5 - Metodologias que empregaram a técnica de PS-MS para determinação de diferentes analitos em leite e vinho.

| Analito | Matriz | Modo iônico | Transições (m/z) | Energia de colisão (V) | Distância (mm)* | Voltagem do capilar (V) | Potencial (kV) | Temperatura do capilar (°C) | Lentes (V) | Tempo de varredura (s) | Ref. |
|--|--------|-------------|---|------------------------|-----------------|-------------------------|----------------|-----------------------------|------------------|------------------------|----------------------|
| Amoxicilina, penicilina-G, cloxacilina | Leite | + - - | 366,00- 349,01 333,27- 192,05 434,20- 293,20 | 10 17 16 | N.I. | N.I. | 3,5 | N.I. | 94, 81, 92 | N.I. | SU, 2018 |
| Melamina | Leite | + | 127-85-65 | N.I. | 10 | 45 | 3-5 | 275 | 100 | N.I. | BASURI, 2019 |
| 36 pesticidas multi-classe | Vinho | + | Vide Tabela 1 | 7-51 5-43 | N.I. | N.I. | 3,5 | 275 | 70 - 240 | 0,1 | GUO, 2019 |
| Resveratrol | Vinho | + | 227-185 | 18 | N.I. | 60 | 5,0 | 35 | 700 | 0,1 | DI DONNA, 2017 |
| Penflufeno, Isopirazam, Fluxaproxad, Piraclostrobina, Bixafeno | Vinho | + | 318-141,2- 234,1 360,0- 244,2- 320,2 382,0- 342,1- 314,1 388,0- 163,3- 149,2 414,0- 266,2- 374,1 | N.I. | 5 | N.I. | 2,5 | 200 | 100 | 0,1 | PU, 2017 |

| | | | | | | | | | | | |
|--|------------------|--------|-------------------------------|------|------|------|-----|------|------|------|---------------|
| Alacloro, acetoclor, petilacloro, butacloro, metolacloro, napropamida, benzenacetamida | Leite | + | 270-162 | 19 | N.I. | N.I. | 3,5 | 270 | 69 | N.I. | WANG, 2015 |
| | | | 270-133 | 29 | | | | | 53 | | |
| | | | 312-352 | 16 | | | | | 70 | | |
| | | | 312-162 | 21 | | | | | 80 | | |
| | | | 284-252 | 14 | | | | | 59 | | |
| | | | 271-170 | 18 | | | | | 57 | | |
| 239-163 | 16 | 89 | | | | | | | | | |
| Eritromicina, claritromicina, roxitromicina | Leite materno | + - | 576-558 590-558 679-558 | N.I. | 10 | N.I. | 3,5 | N.I. | N.I. | N.I. | DENG, 2016 |

N.I. = Não informado.

*Distância entre a ponta do papel e o cone do espectrômetro de massas.

A quantificação de BA ainda é problemática devido à sua baixa concentração em amostras de leite e vinho, e também, devido à complexidade das amostras, ausência de cromóforos de BA e presença de substâncias potencialmente interferentes. Não obstante, a cromatografia líquida com detector de fluorescência é, de longe, a técnica mais relatada para a determinação desses compostos em amostras de leite e vinho, no entanto, existe a dificuldade em desenvolver um método de derivatização que reside na escolha do reagente adequado, a qual atenda às exigências dos seguintes critérios: método de análise, seletividade, compatibilidade com as condições de reação necessárias e possibilidade de trabalhar no modo de pré-coluna, tornando assim uma técnica complexa (JASTRZEBSKA et al., 2016).

2.5 Técnicas de preparo de amostras para determinação de BA

A aplicação de procedimentos de determinação de aminas biogênicas em alimentos tornou-se uma necessidade devido, principalmente, ao seu potencial de toxicidade e a possibilidade de serem utilizadas como indicadores de qualidade alimentício. Independentemente do método, existem dois agravantes nas análises de aminas biogênicas. O primeiro é a complexidade da matriz e as baixas concentrações dos compostos presentes. Devido interferentes presentes na matriz, a determinação simultânea de aminas acaba se tornando complexa de ser realizada. Para se ter um resultado mais preciso, é imprescindível um processo de extração que consigam separar as aminas biogênicas de outros compostos com maior eficiência. (TORRE, 2013)

O tipo e a natureza das aminas e dos alimentos a serem analisados afetam diretamente na eficiência da extração. Nessa etapa, existem dois parâmetros que devemos levar em consideração: o solvente utilizado e o preparo da amostra. As reações de protonação das BA e sua reversão para a forma não protonada, em função do pH, são de extrema importância para o seu isolamento e para a análise dessas substâncias, bem como a solubilidade das BA e de seus sais, em soluções aquosas e/ou em solventes orgânicos. (CUSTÓDIO, 2006)

De acordo com estudos feitos por da Silva, as BA apresentam elevada solubilidade em água e clorofórmio quente, já em sua forma de sal, elevada solubilidade em água e metanol, e média em etanol. (DA SILVA, 2008)

A extração de BA de uma matriz sólida pode ser realizada utilizando-se água à temperatura ambiente ou a temperaturas elevadas, solventes orgânicos ou reagentes ácidos. Solventes orgânicos, como metanol, acetona, etanol e acetonitrila-ácido perclórico, já foram utilizados para extrair aminas livres. (DA SILVA, 2008) Na extração de aminas ligadas a outros componentes da matriz, são empregados reagentes ácidos, como ácido clorídrico, ácido perclórico e ácido tricloroacético. (TORRE, 2013)

O preparo de amostras pode corresponder a 80% do tempo total da análise e ser a maior fonte de erro dependendo da matriz e da técnica que será utilizada. A maioria dos métodos requerem um pré-tratamento além de uma técnica de preparo de amostra, visando a extração e pré-concentração de analitos, eliminação de compostos interferentes, limpeza (*clean up*) e/ou compatibilização química e ou física das amostras com o sistema analítico empregado (CLARKE'S, 2013). Desta forma, o preparo de amostra contribui significativamente para o aumento da detectabilidade e da seletividade em análises químicas. Devido a importância dessa etapa, foram desenvolvidas diversas técnicas e métodos de preparo de amostras, principalmente para amostras com matrizes complexas (CAMPOS et al., 2015), conforme a Tabela 6.

Tabela 6 - Revisão de metodologias para extração de aminas biogênicas.

| Analito | Preparo de amostra | Matriz | Ref |
|--|---|--|-----------------------|
| HIS, TRM, PUT, CAD, SPD | Sistema de microfluidos (CEME) | Linguiça | ZARGHAMPOUR 2018 |
| TRM, CAD, PUT, SPD, SPM, TYR, HIS, AGM | Diluição e filtração | Cerveja e vinho caseiro (saborizado) | NALAZEK-RUDNICKA 2017 |
| PUT, HIS, TYR, AGM, PUT, TRM, CAD, PEA | Descarbonatar Filtração | Cerveja | REDRUELLO 2017 |
| PUT, CAD, TRM, PEA, SPD, SPD, HIS | Extração em fase sólida dispersiva (DSPE) | Vinho tinto, branco e do porto | MILHEIRO 2019 |
| TYR, PUT, CAD, SPD, HIS | PP | Leite fermentado de vaca e cabra | COSTA 2015 |
| CAD, HIS, PEA, PUT, SPD, SPD, TYR, TRM | LLE SPE | Peixe | SAGRATINI 2012 |
| PEA, HIS, TYR, SPD, SPD | MIL-DLLME | Vinho e peixe | CAO 2019 |
| TYR, TRM | Precipitação e filtração | Vinho branco, vinho de arroz e cerveja | HUANG 2019 |
| HIS | SLE | Peixe | NADEEM 2019 |
| CAD, HIS, PEA, PUT, TRM, TYR, SPD, SPD | SPE | Peixe | OCHI 2019 |
| HIS | SLE | Peixe | ALTIERI 2016 |
| HIS, TRM, TYR, PEA | LLE | Vinho | JASTRZEBSKA 2016 |
| SPD, SPD, PUT, CAD, HIS, PEA, TRM, TYR | <i>Clean-up</i> Filtração | Cerveja e vinho | DANIEL 2015 |
| TYR, HIS, PUT, CAD | μ DLLME EME | Peixe enlatado | KAMANKESH 2019 |

O emprego de campo elétrico para auxiliar processos de extração vem ganhando grande destaque nos últimos anos. A migração de espécies eletricamente carregadas (íons), devido à aplicação de um campo elétrico em um sistema de extração, proporciona um aumento da cinética de transferência (extração) dos analitos entre uma solução doadora (amostra) e uma solução aceptora. Sendo que, a direção de migração das espécies positivas e negativas pode ser controlada pela orientação do campo elétrico, contribuindo para uma maior seletividade do processo de extração (MOREIRA, 2018).

Assim, o processo de eletroextração segue uma tendência mundial em química analítica e traz as conhecidas vantagens, como a maior portabilidade, rapidez e menor consumo de amostras e reagentes, e especificamente neste presente trabalho uma boa extração devido a matriz ser líquida e as BA serem muito polares. A Tabela 7 apresenta algumas metodologias que empregaram técnicas de eletroextração para determinação de amins biogênicas em diferentes matrizes. Foram encontrados poucos trabalhos, sendo que nenhum trabalhou com as matrizes de leite e vinho, demonstrando o potencial inovador do desse trabalho, ademais, nenhuma das técnicas de análise utilizou o PS-MS.

Tabela 7 - Metodologias que empregaram técnicas de eletroextração para determinação de aminas biogênicas em diferentes matrizes.

| Analito | Matriz | Fase doadora | Filtro orgânico | Fase aceptora | Potencial (V) | Tempo (min) | Técnica de análise | Ref. |
|--|----------------|-------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------|-------------|--------------------|-------------------|
| HIS, TRM, PUT, CAD, SPD | Linguiça | Ausência de HCl | NPOE contendo 10% (v / v) DEHP. | 90 mmol L ⁻¹ de HCl | 40 | 33 | HPLC-UV | ZARGHAMPOUR, 2018 |
| TYR, HIS, PUT, CAD | Peixe enlatado | N.I. | 1-octanol | 0,1 mol L ⁻¹ de HCl | 150 | 30 | GC-MS | KAMANKESH, 2019 |
| Serotonina (5-HT), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) | Urina | Acidificada para 1 M FA | Água saturada EtOAc | - | 3000 | 8 | CE-UV | OEDIT, 2020 |

N.I. = Não informado.

2.6 Espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS)

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica que apresenta diversas vantagens como: alta seletividade, baixos limites de detecção e ampla versatilidade. Desde o seu surgimento 1897 com os trabalhos de Thompson, essa técnica vem sendo constantemente aprimorada e aplicada em análise de misturas cada vez mais complexas para determinação de diversas substâncias em baixíssimas concentrações. Para tal, novas fontes de ionização veem sendo desenvolvidas e os analisadores de massas sendo aperfeiçoados. (PEREIRA, 2020)

O princípio da MS, basicamente, consiste na transferência ou geração de íons em uma fonte de ionização e posteriormente, sua separação ou diferenciação de acordo com as diferentes razões massa/carga (m/z) dos íons em um analisador de massas, seguido pela detecção dos íons e seu processamento por um sistema apropriado. (WANG *et al.*, 2010) A técnica de ionização desempenha um papel fundamental na MS, já que não há uma técnica universal para ionizar todos os analitos em diferentes matrizes. É necessário que de acordo com a estrutura química e grupos funcionais presentes na amostra, utilize-se uma técnica de ionização adequada. Portanto, grande parte dos progressos de análises por MS estão ligados aos avanços das técnicas de ionização. (BARBOSA, 2021)

Uma variedade de fontes de ionização são capazes de produzir íons livres dos analitos presentes em uma amostra de interesse para serem posteriormente analisados por espectrometria de massa. (WANG *et al.*, 2010) Em 2010, foi desenvolvida a espectrometria de massa com ionização por *paper spray* (PS-MS) que vem ganhando cada vez mais atenção devido à sua praticidade, simplicidade, baixo custo, rapidez, alta eficiência, análise qualitativa e semi-quantitativa. A técnica PS-MS, mostrada na Figura 2, consiste em adicionar uma pequena quantidade de amostra (aproximadamente 5 a 10 μL) ao papel na forma de triângulos equiláteros com dimensões de 1,5 cm na entrada do espectrômetro de massa. Em seguida, o papel é

umedecido com uma mistura de solventes para facilitar o processo de ionização e, por fim, uma tensão é aplicada em seu fundo para induzir uma formação de um fino spray de gotículas de solvente onde há os íons dos analitos, na forma de cone de Taylor. (WANG et al., 2010)

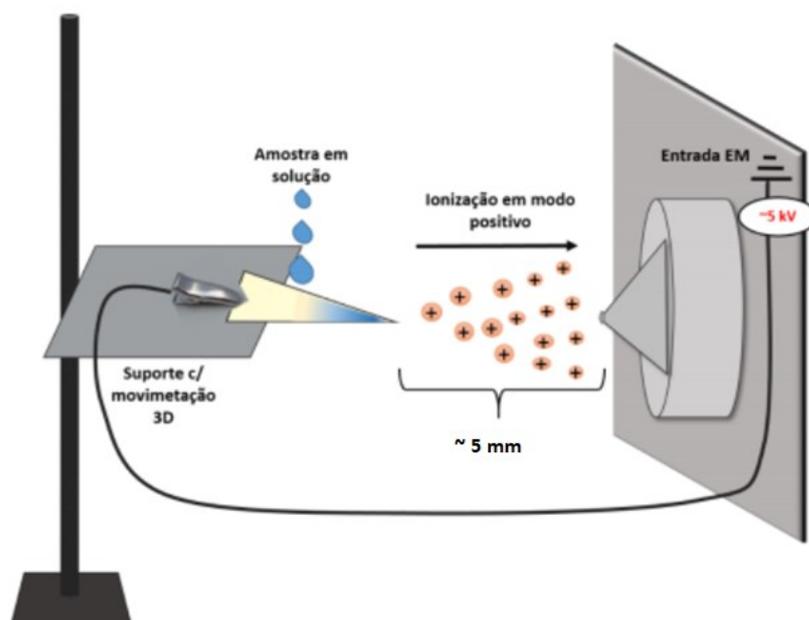


Figura 2 - Representação simplificada de como funciona a técnica de paper spray (BARBOSA, 2021).

O substrato utilizado e suas propriedades são fundamentais para o desempenho do método PS-MS. Por ser um material poroso hidrofílico, o papel é capaz de reter em sua estrutura de microcanais componentes da amostra que são insolúveis no solvente de pulverização. Assim, os efeitos indesejáveis da matriz são reduzidos ou mesmo eliminados, o que é uma das maiores vantagens dos sistemas PS-MS. Outro aspecto é o transporte da fase móvel através do substrato que ocorre principalmente por meio de dois mecanismos: ação capilar e movimento da solução como um filme fino. No primeiro caso, a permeação do líquido ocorre em todas as direções através da microestrutura do papel, por meio de poros e microcanais. O

segundo mecanismo é o resultado da adição de solvente em excesso, de modo que à medida que o líquido é consumido para criar o *spray*, o filme formado se move em direção ao final do substrato, ejetando os analitos até o detector. (MIRANDA, 2019)

2.7 Uso da impressão 3D em métodos analíticos

O uso de impressoras 3D para o desenvolvimento de dispositivos analíticos, vem desempenhando um papel importante na inovação na fabricação e prototipagem de hardwares e sensores. (CARDOSO, 2020) Devido suas inúmeras vantagens, bem como o elevado número de impressoras comerciais disponíveis, esta tecnologia tem surgido como um método promissor para a prototipagem rápida de dispositivos. (DUARTE, 2016)

O processo de impressão 3D envolve a criação de peças sólidas com base em uma deposição de camada por camada controlada de um material polimérico. A primeira etapa de um processo de impressão 3D compreende a concepção de uma imagem virtual do objeto, que é comumente obtido por meio de software de design auxiliado por computador (AutoCAD). Em seguida, o desenho 3D é convertido em um arquivo de coordenadas e parâmetros de impressão (velocidade, temperatura, etc) compatível com software de impressora 3D. Deste ponto, a impressora 3D pode criar o objeto 3D por deposição de material camada por camada, como representado pela Figura 3. (CARDOSO, 2020)

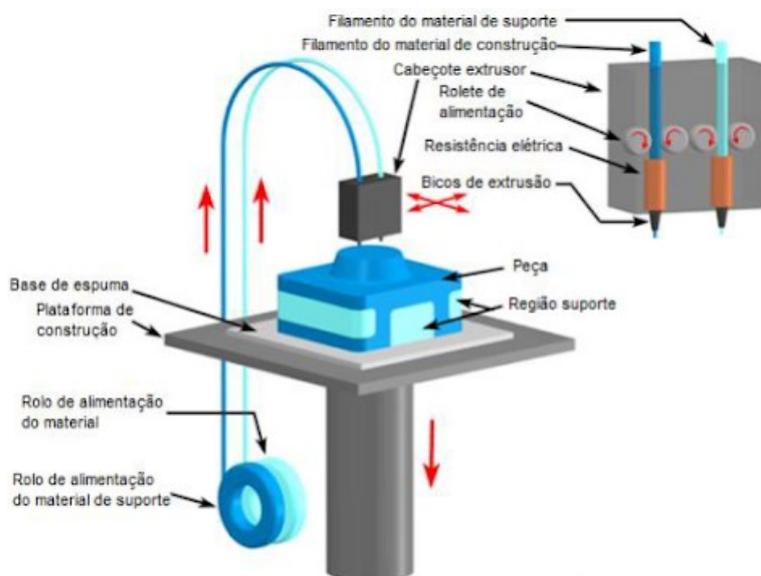


Figura 3 - Esquema de deposição de material por uma impressora 3D do tipo filamento ou FDM (Modelagem de Deposição Fundida)(Fonte: Protofest).

Dependendo das aplicações dadas aos protótipos desenvolvidos e do tipo de impressora utilizada, têm-se uma variedade de polímeros que podem ser utilizados para a sua produção. Para as impressoras do tipo filamento os polímeros mais utilizados são: acrilonitrila butadieno estireno (ABS), ácido polilático (PLA) e elastômero termoplástico (TPE). O ABS e PLA são materiais rígidos e leves que apresentam uma boa resistência e flexibilidade. O fato do PLA ser biodegradável torna esse material menos agressivo ao meio ambiente. Por outro lado, TPE é um material com comportamento semelhante à borracha com propriedades elásticas e flexíveis. (DA SILVA, 2018)

Diversos métodos de prototipagem podem ser classificados como tecnologia de impressão 3D, destacando-se a modelagem por deposição fundida, descrita anteriormente. A seguir na Tabela 8 é apresentada uma síntese das principais técnicas de impressão tridimensional. (DABAGUE, 2014)

Tabela 8 - Diferentes tecnologias de impressão 3D.

| Tipo de técnica | Tecnologia | Materiais |
|-----------------------------|--------------------------------------|---|
| Polimerização fotossensível | SLA – Estereolitografia | Foto polímeros e resinas |
| Extrusão | FDM – Deposição de filamento fundido | Termoplásticos, misturas e metais eutéticos |
| Granular | SLS – Sinterização a laser | Ligas metálicas: titânio, alumínio aço inoxidável |
| Granular | SLM – Derretimento a laser | Termoplásticos, pósmetálicos e cerâmicos |
| Polimerização | Polyjet | Resinas e foto polímeros combinados |

A prototipagem por impressão 3D mostra vantagens únicas na prototipagem rápida de diferentes estruturas com diversas aplicações. A química analítica foi recentemente beneficiada com a tecnologia de impressão 3D, onde a liberdade de desenvolvimento com diversos designs possibilita pesquisadores criarem novos dispositivos de preparo de amostra e detecção eletroquímica. (CARDOSO, 2020)

Por essas razões, a impressão 3D vem se apresentando como uma ferramenta de fabricação popular para uma variedade de segmentos e áreas (Figura 4). Esta popularidade é evidenciada na diversidade de artigos recentes em que a impressão 3D encontrou aplicação, incluindo eletroquímica (JOÃO, 2021), engenharia de tecidos (MURPHY, 2014), biológica (MITSOURAS, 2015), medicina (LUPTON, 2015), dispositivos de laboratório (CIUBARĂ, 2013), e estudos ambientais (DE SCHUTTER, 2018). Com impressora reduzida e custos de material, as impressoras 3D estão se tornando comuns em laboratórios analíticos onde estão sendo utilizados em uma ampla matriz de aplicações. Esta revisão destaca a impressão 3D técnicas e

aplicações analíticas e bioquímicas ciência, com ênfase na pesquisa emergente nos últimos 2 anos. (GROSS, 2016)

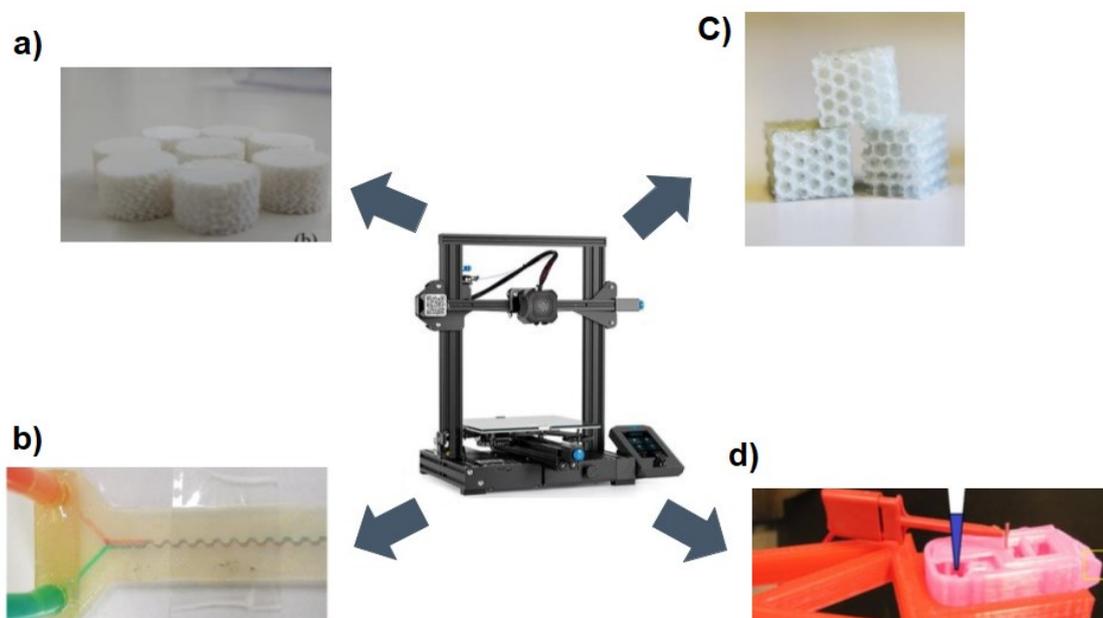


Figura 4 - Prototipagem com impressão 3D visando diferentes segmentos. a) Suporte de ácido polilático impresso em 3D. b) Micromisturadores impressos em 3D utilizando termoplástico PLA. c) Blocos de espumas de isolamento térmico à base de cortiça impressas em 3D.

Na Figura 4 podemos evidenciar algumas dessas aplicações, como: a) suportes de poli (ácido láctico), impressos em impressora 3D, projetados a fim de maximizar a superfície de contato entre enzima e suporte, através da elaboração de pequenos poros ao longo de toda a extensão do mesmo, para aplicações químicas (IZIDORO, 2019); b) espumas de isolamento térmico impressas em 3D com material macro ajustável e com porosidade em microescala, utilizando cortiça residual da produção de rolhas de garrafas de vidro, para aplicação em projetos de arquitetura e engenharia civil (SILVA, 2020); c) micromisturadores impressos em 3D com o termoplástico PLA, com conexão com a bomba seringa para injeção dos líquidos, empregados principalmente em análise bioquímicas (DUARTE, 2016); d) cartucho produzido por meio de uma impressora 3D, com tecnologia FDM, visando melhora do desempenho da técnica de geração de spray por papel em espectrometria de massas, permitindo

fornecimento contínuo de solvente, com aplicação em análises de estruturas químicas (DUARTE, 2016).

As impressoras to tipo FDM foram patenteadas em 1990 por Scott Crump, fundador da empresa Stratasys e tem as vantagens de ter mecânica de impressão simples e a uma grande variedade de insumos para a impressão. (GROSS, 2017) As FDM são o tipo de impressora e impressão mais econômicas e vem sendo amplamente utilizada para o desenvolvimento de novos métodos analíticos. (WAHEED, 2016)

Em um estudo apresentado por Gross, uma impressora 3D FDM foi utilizada para prototipar dispositivo microfluídico baseado no polímero ABS composto de um reservatório de amostra e canal (3 cm de comprimento 500 µm de largura x 500 µm de altura). O dispositivo utilizado em um espectrômetro de massas com ionização por *paper spray*, teve acoplada em sua extremidade uma ponta de papel direcionando para a fonte do equipamento. Para facilitar a ionização, 4 kV foram aplicados ao reservatório de amostra com a ponta de papel posicionada 3 mm da entrada de massa, e o spray permaneceu estável por períodos superiores a 10 min. A funcionalidade dos dispositivos impressos foi avaliada com soluções padrão de cafeína, xilose, tintas para caneta esferográfica e lisozima. (GROSS, 2017)

Este exemplo destaca a integração da impressão 3D com esquemas de detecção, e o seu grande potencial de utilização para auxiliar no desenvolvimento de novos métodos analíticos.

3 PARTE EXPERIMENTAL (METODOLOGIA)

3.1 Materiais e reagentes

Os padrões analíticos dicloridrato de feniletilamina, putrescina, dicloridrato de histamina, dicloridrato de cadaverina, cloridrato de tiramina, triptamina, tricloridrato de espermidina, espermina e sulfato de agmatina foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). O reagente derivatizante cloreto de dansila foi obtido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). Os solventes metanol (MeOH) e isopropanol foram obtidos da J. T. Baker (Center Valley, PA, EUA), a acetonitrila (ACN) da Merck (Darmstadt, HE, Alemanha) e o 1-octanol da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos), todos grau cromatografia de pureza. Os reagentes grau P.A. (Para Análise) ácido fórmico e acetato de amônio (NH₄Ac) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, HE, Alemanha), o ácido acético (HAc) da F. maia (Belo Horizonte, MG, Brasil). A água deionizada (18,2 MΩ cm⁻¹) foi obtida do sistema Milli-Q water purification (Millipore, Bedford, MA, EUA). Foram utilizados papéis cromatográficos dos tipos Whatman 1 Chr e 3MM Chr (Little Chalfont, Bucks, Inglaterra), cortados em formato retangular com dimensões aproximadas são 4,7 cm de comprimento por 0,4 cm de largura e com uma das extremidades na forma de um triângulo isósceles com ângulo central de 40°.

3.2 Equipamentos

Os reagentes sólidos foram pesados em balança analítica Shimadzu ATX 224, a aplicação de potencial ao sistema de eletroextração foi realizada através de uma fonte de eletroforese KASVI K33-300V. Para o registro da corrente elétrica utilizou-se o multímetro Tekpower TP4000ZC, através do qual foi realizada a aquisição de dados. Os protótipos desenvolvidos foram feitos no software Autodesk Fusion 360 e

impressos em uma impressora 3D Creality Ender-3 Printer. Para a dessorção dos analitos utilizou-se vortex Velp Scientifica ZX Class e ultrassom Ultasonic Ney 28B. As análises foram realizadas no sistema espectrômetro de massas Thermo Fisher LQC-Fleet com analisador do tipo gaiola de íons (*ion trap*)(San Jose, Califórnia, USA) e no UPLC® Acquity H Class (Waters) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo TQD (Waters) com fonte de ionização por *eletrospray* e analisador do tipo triplo quadrupolo.

3.3 Preparo e armazenagem das soluções estoques

As soluções estoque dos analitos histamina, feniletilamina, tiramina, triptamina, cadaverina, putrescina, espermidina, espermina e agmatina a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas pesando cada sal e solubilizando-os individualmente em uma solução de metanol/água (1:1, v/v). As soluções estoque foram armazenadas a 4°C . A partir delas foram preparadas para cada experimento uma solução (*pool*) contendo os cinco analitos a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada.

3.4 Matriz de análise

Amostras de leite e de vinho foram adquiridas no comércio local de Belo Horizonte, Minas Gerais.. Foi feito um experimento de precipitação proteica onde foi adicionada acetonitrila às matrizes nas seguintes proporções 1:1, 1:2 e 1:5. Em seguida, essa mistura foi agitada no vortex a 2000 rpm por 15 segundos para melhor homogeneização e centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos.

A solubilidade das proteínas em acetonitrila é menor do que em água. Isso acontece porque a água apresenta constante dielétrica bastante elevada. O leite contém água e moléculas proteicas, logo temos as seguintes interações: interação água-proteína e interação proteína-proteína. Nesse caso, o primeiro tipo de interação prevalecerá sobre o segundo porque a água possui grande capacidade de separação

das partículas do soluto (constante dielétrica elevada). Para a acetonitrila, a constante dielétrica é bem inferior à da água e, assim, a interação proteína-proteína se sobressai e, conseqüentemente, a proteína precipita. (LDB, 2017)

3.5 Desenvolvimento do Hardware de eletroextração (EE) utilizando uma impressora 3D

Para realização dos estudos de eletroextrações utilizou-se um dispositivo multipoços que contém: (a) um sistema de agitação magnética, (b) a fonte de alimentação de energia, (c) quatro poços para posicionamento do tubo de eletroextração e (d) os terminais elétricos ligados a fonte de diferença de potencial elétrico, como representado pela Figura 5.

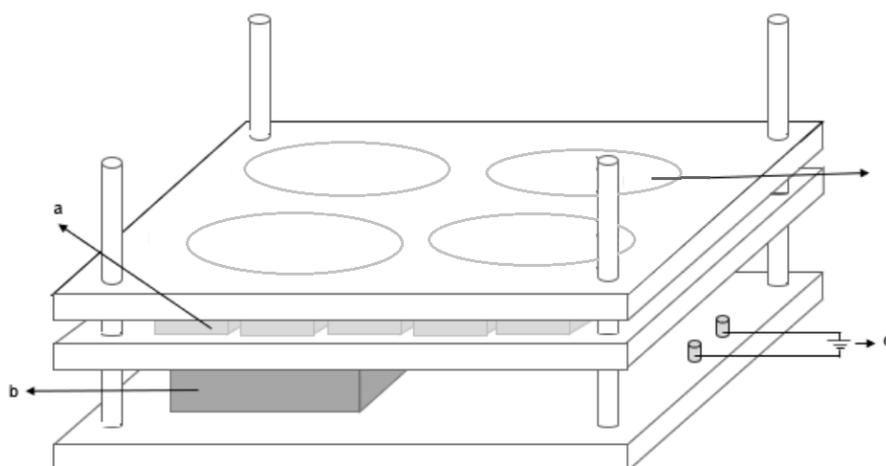


Figura 5 - Esquema ilustrativo do dispositivo multipoços para eletroextração. Adaptado de Miranda 2020.

Foram projetadas tampas para tubos de polipropileno adaptadas com encaixe para eletrodos e para o papel de extração. As tampas foram desenhadas no software AutoCad Fusion 360 e posteriormente o arquivo de extensão .stl foi convertido para a extensão .gcode utilizando o software Ultimaker Cura 4.9.1, onde foram determinados os parâmetros de impressão. As peças foram impressas empregando o filamento de PLA e PET-G XT da empresa 3DFila (Belo Horizonte, Brasil) e a impressora de filamento 3D Creality Ender-3 Pro (Shenzhen, China) (Tabela 9).

Tabela 9 - Parâmetros de impressão para diferentes tipos de polímeros.

| Polímero | Temperatura da Mesa (°C) | Temperatura de impressão (°C) | Fluxo (%) |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------------|------------------|
| PLA | 65 | 205 | 100 |
| PET-G | 110 | 250 | 85 |

3.6 Desenvolvimento do Hardware para acoplar no espectrômetro de massas utilizando uma impressora 3D

Projetou-se um novo dispositivos de acoplamento que integrasse o hardware de eletroextração e o espectrômetro de massas de uma forma simples e rápida. Esse hardware foi acoplado na entrada da fonte do espectrômetro no lugar do sistema de eletro nebulização original do fabricante (ESI).

Neste sistema, o hardware desenvolvido para eletroextração foi acoplado ao a mesa de movimento manual (eixos x, y e z) de modo a garantir o melhor alinhamento entre o papel e a entrada do espectrômetro de massas. Todo esse sistema foi impresso utilizando filamentos de ácido poliláctico, e as condições de impressão foram as mesmas relatadas no item 3.5.

3.7 Montagem do sistema de eletroextração

O preparo de amostra foi conduzido através da eletroextração dos analitos utilizando um sistema desenvolvido. Esse sistema foi constituído basicamente de um tubo de polipropileno de fundo chato com capacidade de 13 mL de fundo. Sob o tubo uma tampa foi adaptada para receber o papel cromatográfico em formato triangular e o contra eletrodo (eletrodo de polaridade contrária). Para dar suporte ao papel e, ao mesmo tempo, servir de contato elétrico uma tela metálica de aço inoxidável envolvia o papel cromatográfico. O sistema foi baseado e adaptado de trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (AVELAR, 2020). O conjunto é representado pela Figura 6.

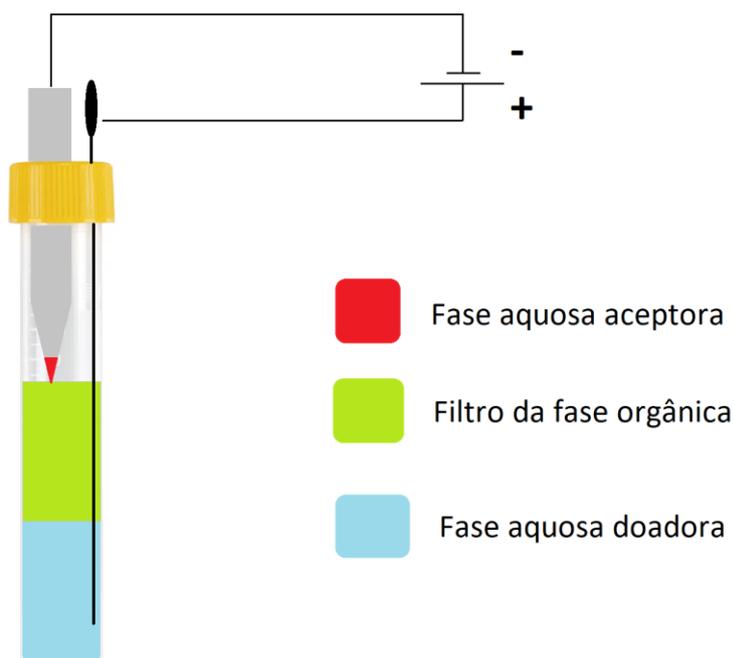


Figura 6 - Ilustração esquemática do tubo, papel e eletrodo para eletroextração.

Nos tubos foram adicionados, a fase doadora constituída de 7 mL de uma mistura 1:1 (v/v) de acetonitrila o filtro orgânico com 5,25 mL de 1-octanol e a fase acceptora embebida em eletrólito (papel cromatográfico impregnado com solução de ácido acético 400 mmol L^{-1}). A fase doadora era fortificada com a solução *pool* contendo os nove analitos a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada um. Para a realização da extração o papel cromatográfico era posicionado com a sua extremidade triangular dentro do filtro orgânico. Ambos os eletrodos foram conectados a uma fonte de eletroforese a 300 V. Como os analitos são catiônicos, o eletrodo inferior foi conectado ao polo positivo e o superior ao polo negativo da fonte. O tempo de extração foi de 10 minutos e todos os estudos foram realizados em triplicata ($n = 3$). A Figura 7 é uma representação simplificada do processo de eletroextração, mostrando as fases do sistema descritas acima.

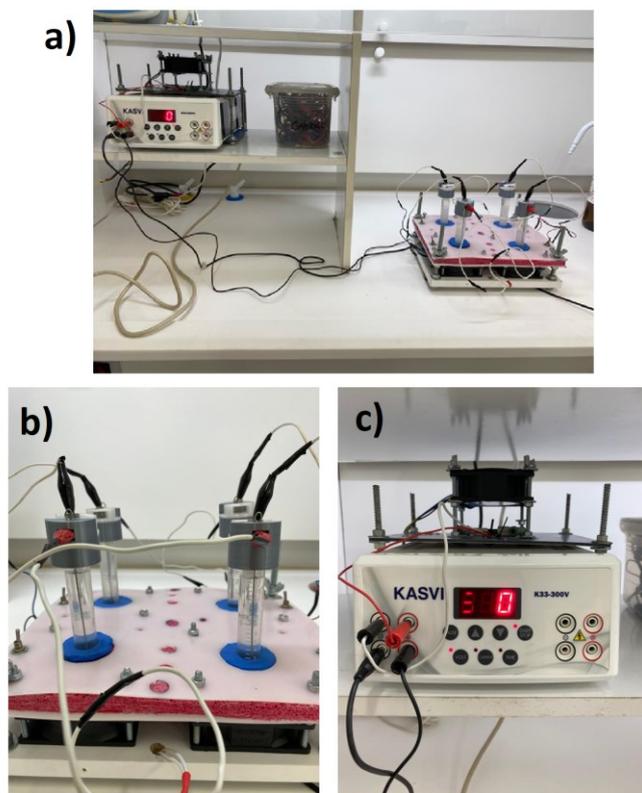


Figura 7 - a) Sistema completo de eletroextração. b) Hardware de eletroextração. c) Fonte para aplicação do potencial.

Após a eletroextração, o papel cromatográfico contendo os analitos era levado diretamente para análise no espectrômetro de massas (análise por PS-MS), ou os analitos foram dessorvidos para análise no UHPLC-MS/MS. Para a dessorção, o papel foi colocado em um microtubo de polipropileno (capacidade 2 mL), então adicionou-se 25 μL de isopropanol em ambos os lados do papel seguido da adição de 500 μL de solução de dessorção (metanol:acetonitrila:ácido acético, 47,5: 47,5: 5, v/v/v), agitação no vortex por 30 segundos a 2000 rpm e, finalmente, sonicação no ultrassom por 10 minutos. Então foram recolhidos cerca de 100 μL da solução para serem injetados no UHPLC-MS/MS. (AVELAR, 2020)

3.8 Prova de conceito para a eletroextração (EE) com corante

A extração do corante azul de metileno foi realizada como prova de conceito para melhor visualização da transferência de um analito carregado da fase doadora para o papel cromatográfico. A solução estoque de azul de metileno (Synth) 1000 mg L^{-1} foi preparada usando o padrão sólido do corante e realizando a sua diluição em água deionizada, sendo armazenada na geladeira a 4°C. Todas as soluções intermediárias de concentrações menores que a estoque, necessárias ao trabalho, foram preparadas no momento do uso.

O experimento foi realizado com uma concentração do corante de 10 mg L^{-1} na fase doadora. A amostra de 8 mL foi preparada em tampão:acetonitrila (1:1 v/v), 4 mL de 1-octanol foi usado como filtro orgânico e 70 μL de ácido acético 0,4 mol L^{-1} como eletrólito no papel. O tempo de extração foi de 10 minutos e uma diferença de potencial de 300 V foi aplicado nos eletrodos com polaridade negativa sobre o papel cromatográfico. Todo esse teste foi realizado em triplicata (n=3).

3.9 Análises por PS-MS

Todas as análises foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas LCQ-FLEET (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) operando nos modos positivo (PS-(+)-MS) de leitura de íons. Para a obtenção dos perfis químicos (*fingerprints*), foram coletados espectros em modo *full scan* dentro da faixa de m/z entre 50 e 300.

As análises PS-MS foram realizadas utilizando o suporte desenvolvido pela impressora 3D. Para prevenir efeitos de memória entre análises subsequentes, tanto a entrada do equipamento quanto o clipe metálico que aplica o potencial foram limpos com papel embebido em metanol.

Para obter espectros com a melhor qualidade possível, com sinais intensos, estáveis e com boa relação sinal-ruído, os parâmetros de voltagem aplicada, distância entre a ponta do triângulo e a entrada do espectrômetro de massas, voltagem e temperatura do capilar de transferência, pressão interna e voltagem das lentes foram otimizados inspecionando visualmente a qualidade dos espectros obtidos e, também, pelo monitoramento das propriedades do equipamento. Uma vez otimizados, todos foram mantidos constantes.

A confirmação da identidade química dos compostos detectados foi feita analisando-se os perfis de fragmentação dos íons selecionados. Para tal, foram selecionados os íons de interesse e energias de colisão apropriadas. Em todos os casos, a corrente do spray formado foi acompanhada durante as análises para que não excedesse os limites de segurança do equipamento e a aquisição de dados foi feita armazenando 20 scans. A posterior leitura e tratamento dos dados obtidos foi feita com o software Xcalibur versão 4.1.31.9 (Thermo Scientific, EUA, 2017).

3.10 Estudo univariado das condições que afetam a eletroextração

Estudos foram realizados para avaliar fatores separadamente que possivelmente afetariam a eletroextração. O procedimento foi conduzido conforme descrito no item 3.5 para avaliação do campo elétrico, e conforme descrito no item 3.9 para avaliação do tipo e formato do papel. As possíveis alterações feitas para cada estudo estão descritas a seguir:

- Efeito do campo elétrico pela comparação da eficiência de extração em sistemas com campo aplicado e sem campo com o sistema montado e as demais condições idênticas em ambos os casos.
- Efeito da geometria do papel da fase acceptora (FA) avaliando papéis cromatográficos cortados em formato retangular com dimensões aproximadas de 4,7 cm de comprimento por 0,4 cm de largura e com uma das extremidades na forma de um triângulo isósceles com ângulo central de 40° , e outra apenas no triângulo isósceles de mesmo tamanho (Figura 9).
- Efeito da espessura do papel da fase acceptora avaliando os papéis cromatográficos Whatman™ tipos 1 Chr e 3 MM Chr são ambos constituídos de celulose e com espessuras de 0,18 mm e 0,34 mm, respectivamente.

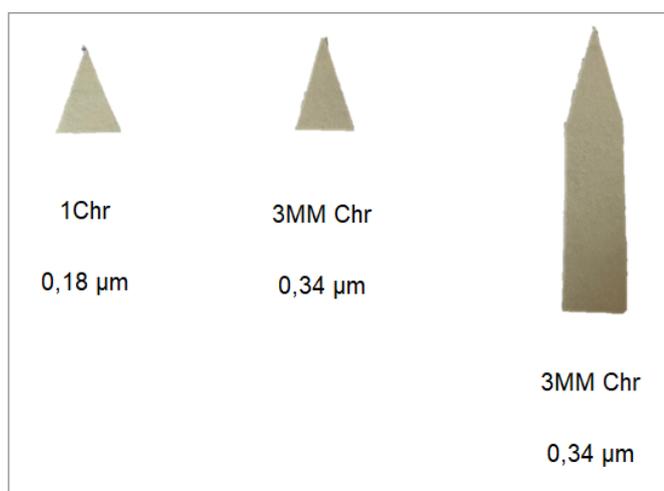


Figura 8 - Modelos de papéis cromatográficos com formatos e espessura diferentes utilizados para ionização no PS-MS.

3.11 Planejamento Box-Behnken para otimização das condições de eletroextração

Esse tipo de planejamento é utilizado para otimização de pelo menos 3 fatores. Logo, foi realizado um planejamento Box-Behnken para avaliar as variáveis: tempo, potencial e percentual de orgânico na fase doadora (% Org FD) de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10 - Níveis e variáveis trabalhadas no planejamento de Box-Behnken.

| | (-) | (0) | (+) |
|---------------------------|-----|-----|-----|
| Potencial elétrico (V) | 50 | 175 | 300 |
| Tempo (min) | 2 | 10 | 18 |
| Acetonitrila* (%) | 0 | 25 | 50 |

*Porcentagem de solvente orgânico na amostra (fase doadora).

Os experimentos foram realizados em triplicata, n=3, e as variáveis de cada experimento realizado estão representados na Tabela 11, onde variamos o potencial de 50, 175 e 300 V, o tempo de 2, 10 e 18 min e a acetonitrila de 0, 25 e 50%. Os dados foram tratados no software Design Expert 11 e os resultados expressos em termos da função desejabilidade.

Tabela 11 - Valores das variáveis potencial elétrico (50, 175, 300 V), tempo (2, 10, 18 min) e percentual de solvente orgânico na fase doadora (0, 25, 50%) para os 13 experimentos do planejamento Box-Behnken.

| Experimento | Potencial (V) | Tempo (min) | Acetonitrila (%) |
|--------------------|---------------|-------------|------------------|
| 01 | - | - | 0 |
| 02 | + | - | 0 |
| 03 | - | + | 0 |
| 04 | + | + | 0 |
| 05 | - | 0 | - |
| 06 | + | 0 | - |
| 07 | - | 0 | + |
| 08 | + | 0 | + |
| 09 | 0 | - | - |
| 10 | 0 | + | - |
| 11 | 0 | - | + |
| 12 | 0 | + | + |
| 13 (Ponto central) | 0 | 0 | 0 |

3.12 Otimização das condições de análise no espectrômetro de massas através do planejamento fracionado 2^{4-1}

Foi considerado para esse experimento distâncias de trabalho variando entre 3 e 6 mm, a voltagem do papel foi de 2 e 4 kV, a temperatura do capilar foi de 250 °C e 325 °C e a voltagem do capilar foi de 15 e 26 V. O planejamento experimental está representado na Tabela 12.

Tabela 12 - Condições experimentais para o planejamento fracionário.

| Experimento | Distância (mm) | Voltagem no papel (kV) | Temperatura do capilar (°C) | Voltagem do capilar (V) |
|-------------|----------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 1 | - | - | - | - |
| 2 | + | - | - | + |
| 3 | - | + | - | + |
| 4 | + | + | - | - |
| 5 | - | - | + | + |
| 6 | + | - | + | - |
| 7 | - | + | + | - |
| 8 | + | + | + | + |
| 9 | - | - | - | - |
| 10 | + | - | - | + |
| 11 | - | + | - | + |
| 12 | + | + | - | - |
| 13 | - | - | + | + |
| 14 | + | - | + | - |
| 15 | - | + | + | - |
| 16 | + | + | + | + |

Parâmetros de análise relacionados a partes distintas nos espectrômetros de massa, não deve ter efeito combinado no sinal análise, então possíveis interações

entre esses parâmetros devem levar a um efeito não significativo, logo, o efeito individual desta variável contribui mais. Assim, o planejamento fracionário é uma boa escolha para este estudo de triagem, pois o único interesse é entender Impacto significativo de cada variável. A resposta utilizada no planejamento é a área Picos das aminas.

3.13 Comparação entre tampão, leite e vinho como fase doadora

Fez-se um experimento para avaliar a contribuição de cada matriz após a precipitação proteica como fase doadora na eletroextração. O procedimento de eletroextração utilizado foi o mesmo apresentado no item 3.7 e as análises foram feitas pelo PS-MS nas mesmas condições do item 3.12. Os experimentos foram feitos em triplicata a uma concentração da solução pool com as BA de 1 mg L^{-1} e o planejamento está representado na Tabela 13.

Tabela 13 - Estudo de experimentos para comparação das fases doadoras.

| Experimento | Matriz |
|--------------------|--|
| 01 | Tampão NH_4Ac 50 mmol L^{-1} |
| 02 | Leite: H_2O (1:1 v/v) |
| 03 | Leite: H_2O (1:2 v/v) |
| 04 | Leite: H_2O (1:5 v/v) |
| 05 | Vinho tinto (1:1 v/v) |
| 06 | Vinho branco (1:1 v/v) |

3.14 Derivatização com Cloreto de Dansila (DBS-Cl) e identificação por PS-MS

O uso de cloreto de dansila na quantificação de aminas biogénicas em vinhos foi proposto num trabalho pioneiro de BATTAGLIA & FRÒLICH (1978). Essa técnica de derivatização dos analitos foi reproduzida nos estudos de ALTIERI (2016), CAO (2019), SAGRATINI (2012) e ZARGHAMPOUR (2018) e é representada pela seguinte reação química (Figura 9), onde é feita uma modificação na estrutura dos compostos de interesse aumentando a sua massa molar.

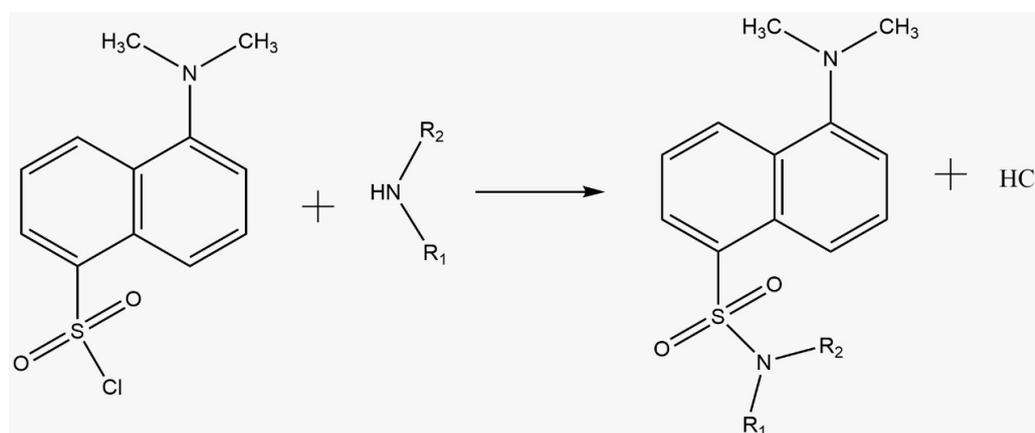


Figura 9 - Reação de derivatização de aminas primárias e secundárias por ação do cloreto de dansila.

Logo, com o intuito de melhorar as análises do PS-MS, fez-se a derivatização utilizando o DBS-Cl, onde foram testados diversos experimentos diferentes variando as condições propostas na Tabela 14, as fontes de aquecimento utilizadas foram uma estufa de secagem e esterilização e uma câmara com uma lâmpada de Infravermelho 250 W. A derivatização foi realizada primeiramente em vial e posteriormente foi aplicado a técnica de derivatização diretamente no papel cromatográfico fortificado com 10 mg L⁻¹.

Tabela 14 - Condições para otimização da derivatização.

| Pool BA | 10 mg L ⁻¹ | | |
|-------------|-----------------------|-----------|----|
| Equipamento | Estufa | Câmara IV | |
| pH | 8 | 9 | |
| Tempo | 15 | 30 | 60 |
| Temperatura | 45 | 60 | 75 |

O procedimento utilizado foi de 40 µL de amostra contendo os analitos ou em vial ou em papel, foi adicionado 40 µL do derivatizante a 5 mg mL⁻¹ e 10 µL de tampão saturado de bicarbonato de sódio (pH = 9,0) ou bicarbonato de amônio (pH = 8,0). A mistura do vial foi levada ao vortex por 1 min e então deixado reagir de acordo com as condições da Tabela 13, ou em estufa ou na câmara de luz. Após a reação o sobrenadante do vial foi recuperado e diluído com MeOH (1:1, v/v) para análise no PS-MS.

3.15 Análise por UHPLC-MS/MS

Foi empregada uma coluna cromatográfica Acquity UPLC® HSS C18 de 50 mm de comprimento, 1,8 µm de tamanho de partícula e 2,1 mm de diâmetro interno. A coluna e o amostrador foram mantidos às temperaturas de 45 °C e 25 °C, respectivamente. A fase móvel A constituiu-se de água deionizada com ácido fórmico a 0,1% (v/v) e a fase móvel B de metanol com ácido fórmico a 0,1% (v/v) com eluição em modo gradiente de acordo com a Figura 10 e vazão de 0,4 µL min⁻¹. O volume de 2 µL de amostra era injetado no cromatógrafo.

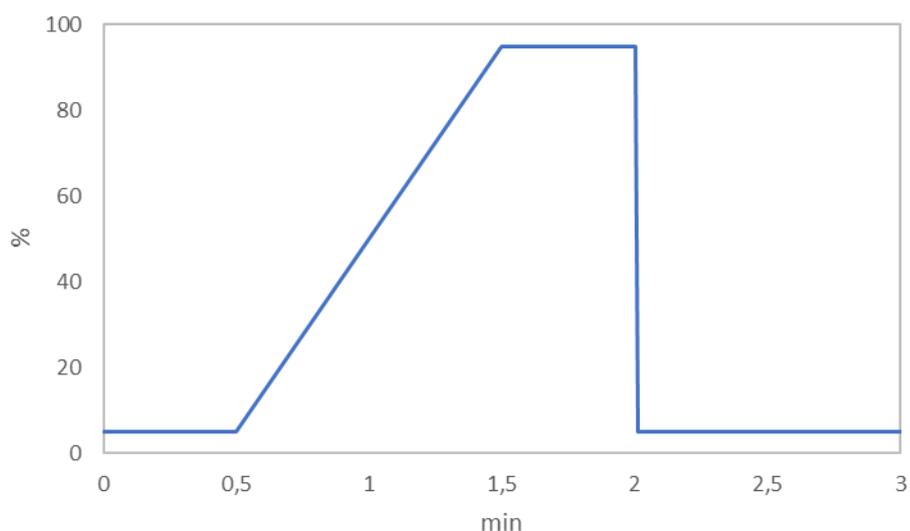


Figura 10 - Gradiente de injeção usado para analisar as BA.

As análises no espectrômetro de massas foram realizadas no modo positivo, onde foram otimizados: temperatura da fonte, temperatura de dessolvatação, voltagem do capilar, vazão dos gases de dessolvatação e do cone. O modo de aquisição de íons é o MRM (monitoramento de reações múltiplas) e os dados são tratados no software MassLynx 4.1. A Tabela 15 apresenta as condições e as transições para cada analito.

Tabela 15 - Condições UPLC-MS/MS para aminas biogênicas.

| | Histamina | | | Putrescina | | Cadaverina | | Tiramina | | | Triptamina | | |
|-------------------------------------|--|--------|-------|--------------|-------|--------------|---------|--------------|--------------|--------|--------------|--------|--------|
| Massa Molar (g/mol) | 111,15 | | | 88,15 | | 102,18 | | 137,18 | | | 160,22 | | |
| Modo | Positivo [+] | | | Positivo [+] | | Positivo [+] | | Positivo [+] | | | Positivo [+] | | |
| Transições | 112,06 | 95,02 | 68,00 | 89,05 | 72,02 | 103,08 | 86,04 | 138,09 | 121,00 | 77,00 | 161,13 | 144,03 | 117,00 |
| Energia de Colisão (eV) | 15,00 | 11,00 | | 15,00 | | 15,00 | | 11,00 | 15,00 | | 11,00 | 15,00 | |
| Voltagem do cone (V) | 30,00 | | | 30,00 | | 30,00 | | 30,00 | | | 30,00 | | |
| | Feniletilamina | | | Agmatina | | Espermina | | | Espermidina | | | | |
| Massa Molar (g/mol) | 121,18 | | | 130,19 | | 202,34 | | | 145,25 | | | | |
| Modo | Positivo [+] | | | Positivo [+] | | Positivo [+] | | | Positivo [+] | | | | |
| Transições | 122,08 | 105,02 | 77,00 | 131,00 | 72,02 | 203,00 | 112,00 | 129,00 | 146,00 | 103,00 | 72,00 | | |
| Energia de Colisão (eV) | 11,00 | 15,00 | | 11 a 15 | | 9,00 | 17,00 | | 13,00 | 13,00 | | | |
| Voltagem do cone (V) | 30,00 | | | 30,00 | | 30,00 | | 30,00 | | | | | |
| Voltagem do capilar | | | | | | | 3,5 kV | | | | | | |
| Temperatura de desolvatação | | | | | | | 350 °C | | | | | | |
| Temperatura da fonte | | | | | | | 120 °C | | | | | | |
| Fluxo do gás de desolvatação | | | | | | | 550 L/h | | | | | | |
| Fluxo gas do cone | | | | | | | 50 L/h | | | | | | |
| Fase móvel A | Água com ácido fórmico a 0,1% (v / v) | | | | | | | | | | | | |
| Fase móvel B | Metanol com ácido fórmico a 0,1% (v / v) | | | | | | | | | | | | |

3.16 Avaliação do tipo e quantidade de solvente na porcentagem de analito desorvido

O processo de desorção após a eletroextração é necessário para que os analitos extraídos no papel cromatográfico possam ser transferidos para o UPLC-MS/MS. Dessa forma, doze misturas de solventes foram testadas a fim de recuperar eficientemente os analitos sorvidos no papel (Tabela 16). O procedimento de desorção foi feito diretamente no papel cromatográfico fortificado com 10 mg L^{-1} , onde dentro de um frasco eppendorf era aplicado a solução de desorção. Em seguida o papel foi agitado em um vórtex por 30 segundos a 2000 rpm e posteriormente levado a um ultrassom por 5 minutos. A solução foi recolhida e analisada no HUPLC-MS/MS.

Tabela 16 - Misturas de solventes de desorção.

| Experimento | Solvente de desorção (v/v) |
|--------------------|---|
| 01 | ACN |
| 02 | H ₂ O |
| 03 | MeOH |
| 04 | H ₂ O:HAc (95:5) |
| 05 | MeOH:HAc (95:5) |
| 06 | ACN:HAc (95:5) |
| 07 | H ₂ O:MeOH:HAc (47,5:47,5:5) |
| 08 | H ₂ O:ACN:HAc (47,5:47,5:5) |
| 09 | MeOH:ACN:HAc (47,5:47,5:5) |
| 10 | H ₂ O:THF:HAc (47,5:47,5:5) |
| 11 | MeOH:NH ₄ Ac 50 Mm (50:50) |
| 12 | DMSO:H ₂ O (50:50) |

3.17 Validação qualitativa do método

O método foi validado de forma qualitativa para leite e vinho utilizando-se os parâmetros de seletividade e limite de detecção. A seletividade de um método instrumental de separação onde é possível avaliar de forma inequívoca todas as substâncias. Na seletividade é avaliada o grau de interferências de espécies como outras substâncias e impurezas presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (TORRE, 2013). Nesse estudo foram feitas análises de 9 aminas a 1 mg.L^{-1} tanto por PS-MS quanto por UHPLC-MS/MS. Já o limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. (BRITO et al., 2003) Os limites de detecção foram determinados experimentalmente, pois foram obtidos valores de medidas dos brancos que se apresentaram como linha de base, não sendo possível determinar pelo desvio padrão. Obteve-se os resultados experimentalmente reduzindo-se a concentração até não ter mais sinal dos analitos, a faixa de trabalho foi de $0,01$ a 1 mg.L^{-1} .

3.18 Determinação das aminas biogênicas em amostras de leite e vinho

Após a confirmação do desenvolvimento da metodologia analítica descrita nas seções anteriores, teve-se como principal objetivo a sua aplicação no estudo das aminas biogênicas presentes em amostras de leite e vinho de amostras comerciais de Belo Horizonte, Minas Gerais. A determinação foi feita através da espectrometria de massas, após o procedimento de preparo de amostras apresentado no item 3.7. Foram utilizadas 8 amostras de leite, sendo leite UHT integral, desnatado e semi-desnatado, e 6 amostras de vinho, sendo 3 de vinho branco e 3 de vinho tinto. As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados foram apresentados de forma qualitativa, onde os picos foram identificados no espectrograma através da razão massa carga (m/z).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Matriz de análise

A precipitação de proteínas como único preparo de amostras ou combinada com outras técnicas de preparo é bem conhecida e relatada (LEIFELD, 2014). Visando remover as proteínas e outros compostos contidos no soro de leite as amostras de leite e vinho foram submetidas à precipitação por adição de acetonitrila. Nas misturas contendo elevado teor água e solvente orgânico, a interação da água com as proteínas é reduzida devido ao fato que as moléculas de água interagem mais fortemente com as moléculas de solvente. A água ordenada nas porções hidrofóbicas das proteínas é substituída pelo solvente, aumentando a entropia e, também, as interações iônicas proteína-proteína, sendo energeticamente favorável, proteínas com grande número de resíduos hidrofóbicos tendem a permanecer dissolvidas na solução orgânica, ocorrendo a precipitação (LEIFELD, 2014).

A princípio, a precipitação proteica de componentes da matriz não representaria necessariamente um problema, porém havia a possibilidade de o precipitado carrear consigo parte dos analitos de interesse. Buscando otimizar a adição de acetonitrila, avaliou-se diferentes percentuais de acetonitrila adicionada à matriz. Esse teste foi realizado com leite integral UHT, vinho tinto e vinho branco.

Para as amostras de vinho, foi estudado uma adição percentual de 50% (v/v) de acetonitrila (Figura 11a-b), onde foi possível precipitar a maior parte das proteínas. Para a amostra de leite foram estudadas adições percentuais de 50, 67 e 83% (v/v) de acetonitrila. O melhor resultado foi alcançado com a adição de 83% (v/v) de acetonitrila (Figura 11c), que resultou em maiores precipitações de proteínas.

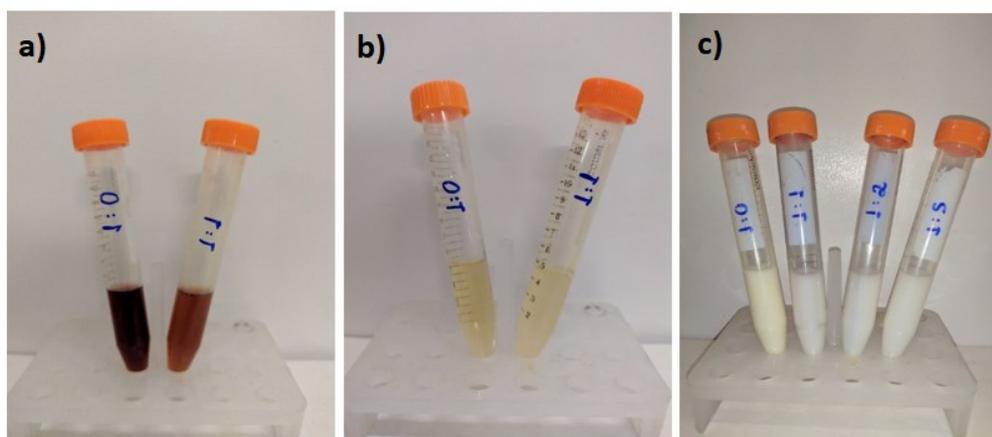


Figura 11 - Teste de precipitação proteica em vinho tinto. b) Teste de precipitação proteica em vinho suave. c) Teste de precipitação proteica em leite integral UHT.

4.2 Desenvolvimento do *hardware* de eletroextração (EE) utilizando uma impressora 3D

Diversos dispositivos de eletroextração veem sendo desenvolvidos por empregar instrumentação simples, de baixo custo e de grande autonomia. Muitos desses dispositivos são prototipados por impressão 3D, e vem ganhando grande espaço devido ao seu grande potencial no que se diz respeito à fabricação de dispositivos científicos personalizados. Diversos trabalhos já foram desenvolvidos, incluindo dispositivos microfluídicos, aplicações em química analítica e eletroquímica. (SILVA, 2018)

Esse dispositivo é de baixo custo, podendo ser facilmente construído, modificado ou até mesmo comercializado. Nesse projeto a utilização de elevados volumes de amostras associado ao PS-MS é a grande inovação, tendo em vista que essa é uma limitação tanto para outros procedimentos de tratamento de amostras como para os trabalhos de PS-MS, descritos na literatura. Empregando volumes de amostras maiores para alimentos que são muito disponíveis e obtendo-se uma eficiência de extração adequado é possível empregar instrumentações e técnicas de

baixa sensibilidade para algumas substâncias o que representa usar equipamento muito mais baratos.

O preparo de amostra foi conduzido através da eletroextração dos analitos utilizando um sistema desenvolvido e personalizado para a problemática proposta no projeto. Esse sistema foi constituído para que um tubo de polipropileno com capacidade de 13 mL de fundo chato fosse utilizado como reservatório de amostra. Uma tela metálica servia para dar suporte ao papel e também permitir o contato elétrico com a fonte de diferença de potencial. Uma primeira versão foi construída empregando somente o filamento de PLA que é muito barato, acessível, possui menores temperatura de trabalho e melhor acabamento de impressão (Figura 12).

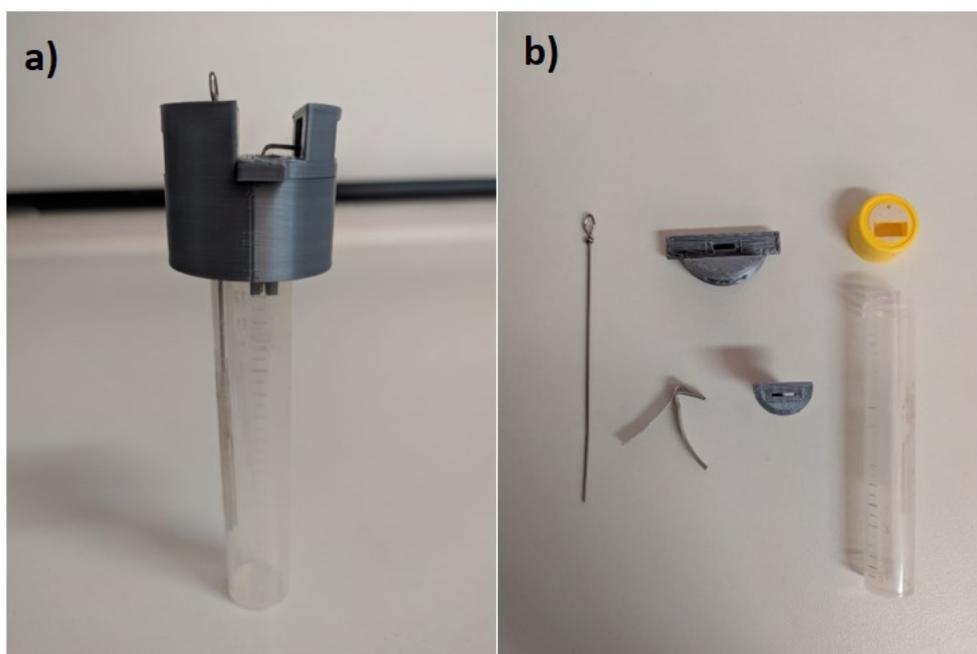


Figura 12 - a) Primeira versão do dispositivo de eletroextração desenvolvido empregando somente o polímero PLA. b) Peças desmontadas do sistema de eletroextração desenvolvido empregando somente o polímero PLA.

Durante os testes iniciais constatou-se a necessidade de utilizar um polímero quimicamente mais resistente uma vez que o teor de acetonitrila presente na amostra atacava a parte do PLA que entrava em contato com a amostra. Criou-se também uma trava para o papel, com o intuito de evitar seu deslocamento na análise, além de algumas modificações nas dimensões do papel para um melhor ajuste ao volume de amostra e posicionamento de sua da ponta dentro do filtro orgânico (Figura 13).

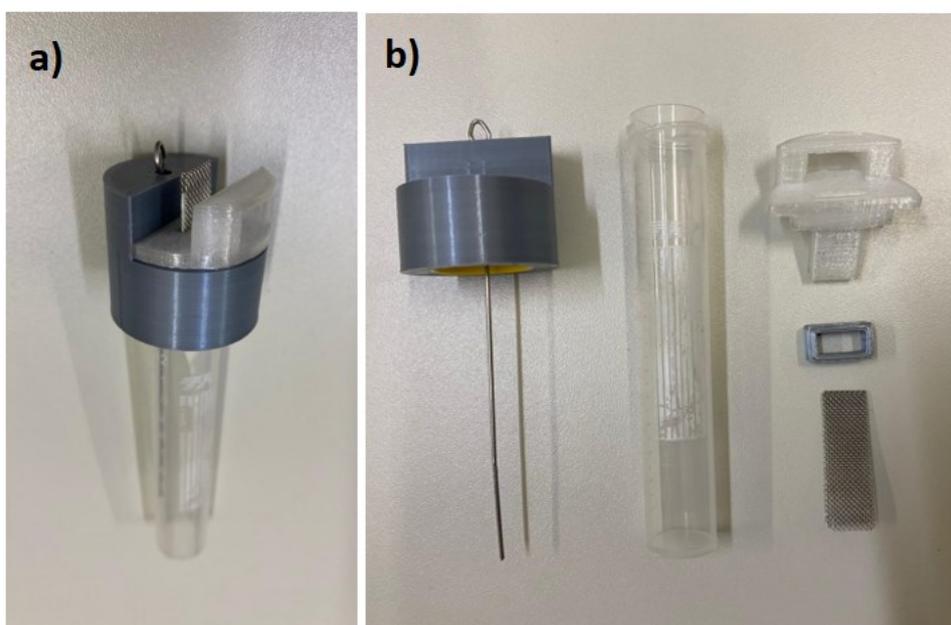


Figura 13 - a) Segunda versão dispositivo para eletroextração desenvolvido empregando o polímero PLA (cinza) e PET-G (incolor). b) Peças desmontadas do sistema de eletroextração desenvolvido empregando o polímero PLA e PET-G.

Todas as vantagens acima são fruto da versatilidade oferecida pela tecnologia de impressão 3D, pois com esta ferramenta é possível fabricar dispositivos com as propriedades analíticas desejadas, o que seria difícil se fosse utilizado sistemas comerciais, onde muitas vezes não há possibilidade de modificação. Ademais, o material desenvolvido é leve, resistente, sem vazamento de amostras e sem efeito de contaminação após o uso.

4.3 Desenvolvimento do Hardware para acoplar no espectrômetro de massas utilizando uma impressora 3D

Para facilitar e integrar o sistema de análise ao de preparo de amostras foi desenvolvido uma interface de posicionamento do papel para acoplar no espectrômetro de massas e realizar análises por *paper spray*, representado pela Figura 14. O dispositivo foi impresso no polímero PLA para se ter uma maior qualidade de acabamento e também porque ele não entra em contato direto com o solvente orgânico não sofrendo assim, nenhum tipo de ataque químico. Esse dispositivo possui deslocamento nos eixos x, y e z, para facilitar o ajuste do papel em relação a fonte do espectrômetro, e um cabo onde é aplicado o potencial elétrico no papel.

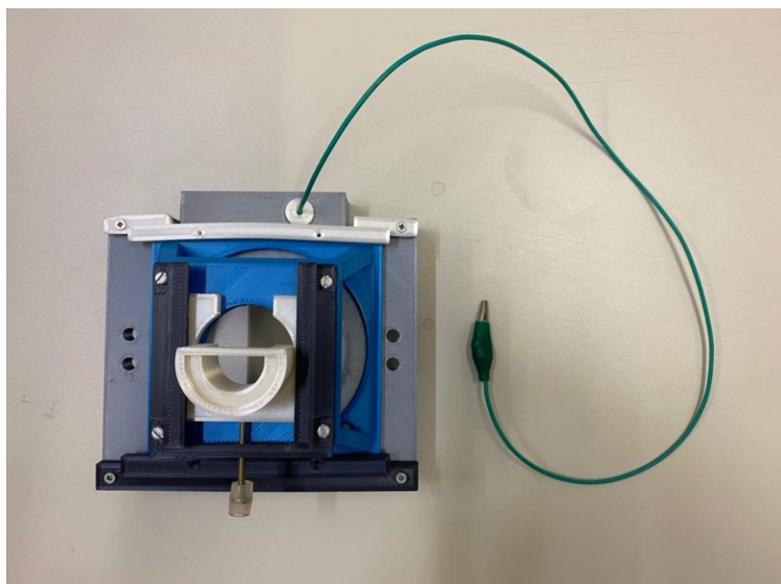


Figura 14 - Dispositivo impresso em impressora 3D com polímero PLA para acoplar na entrada da fonte do espectrômetro de massas.

Para a construção do dispositivos inicialmente, foi feito um modelo tridimensional do dispositivo por meio do sistema CAD utilizando o software gráfico Autodesk Fusion 360, o qual foi exportado para o formato *.stl (stereolithography)*. Em seguida, o

arquivo .stl foi aberto em no software Cura. Existem alguns parâmetros que determinaram o tempo de impressão e a qualidade da peça final como, a velocidade de impressão, a densidade da peça impressa, a temperatura do bico de extrusão e da plataforma de impressão, que são previamente definidos no software Cura. A fidelidade da impressão foi avaliada comparando os valores reais das larguras impressas com os valores nominais das larguras dos canais configurado no software Autodesk Fusion 360.

A antiga fonte de ionização por *paper spray* (Figura 15) não foi adequada para esse sistema devido ao tamanho e formato do papel que trabalhamos, além da dificuldade para posicionamento do mesmo para a análise. Com a nova interface (Figura 16) o posicionamento do papel se tornou mais dinâmico, fácil e reprodutível diminuindo o estresse para análise e a frequência analítica.

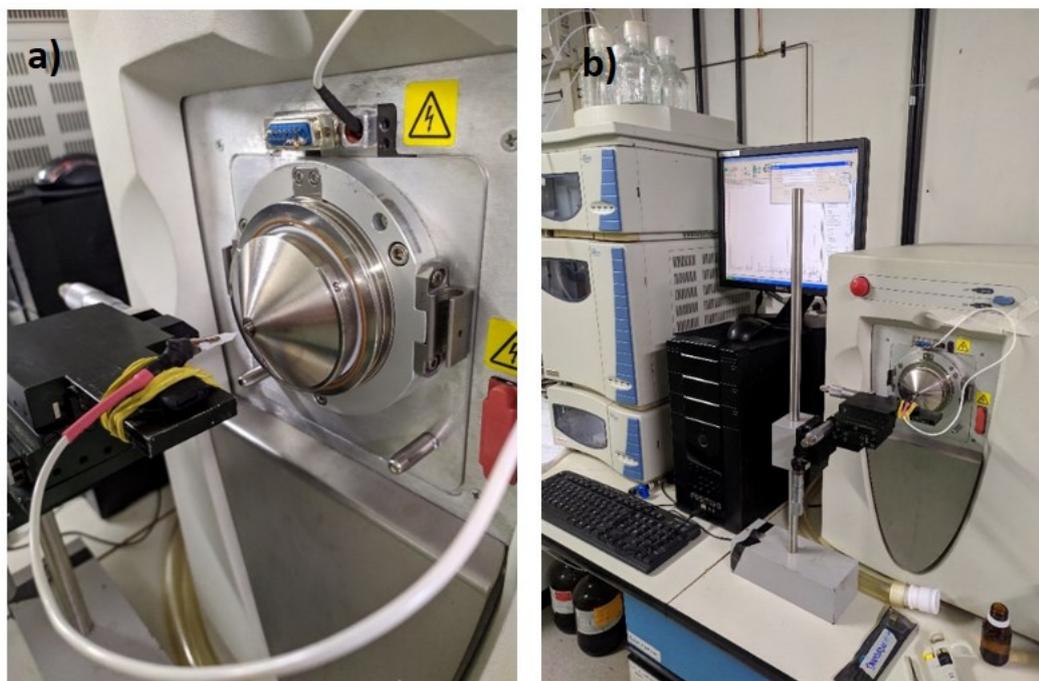


Figura 15 - a) Fonte antiga de ionização por paper spray. b) Espectrometria de massas com ionização por paper spray.

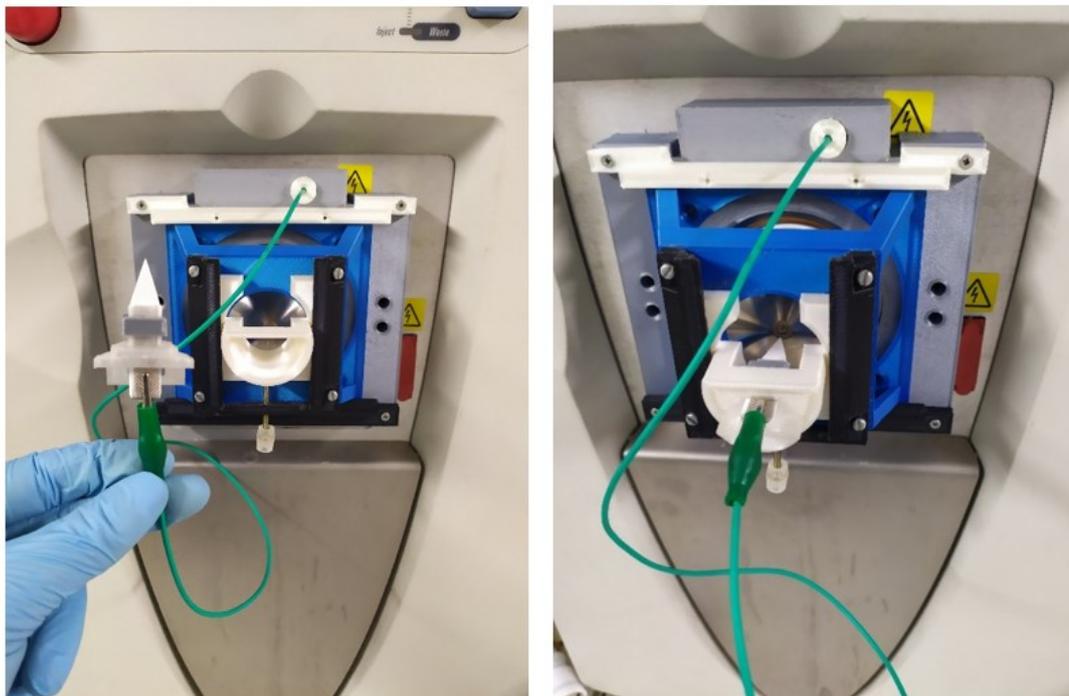


Figura 16 - Dispositivo feito em PLA por impressão 3D para ionização por paper spray no espectrômetro de massas.

4.4 Prova de conceito para a eletroextração (EE) com corante

A eletroextração do corante azul de metileno foi realizada como prova de conceito para melhor visualização da transferência de um analito eletricamente carregado da fase doadora para o papel cromatográfico. Foi possível observar ao dar início à aplicação de potencial elétrico, já nos primeiros segundos, que a extração levou ao aparecimento da coloração azul na ponta do papel cromatográfico, que continuou migrando ao longo do corpo do papel e se distribuindo com o tempo (Figura 17).

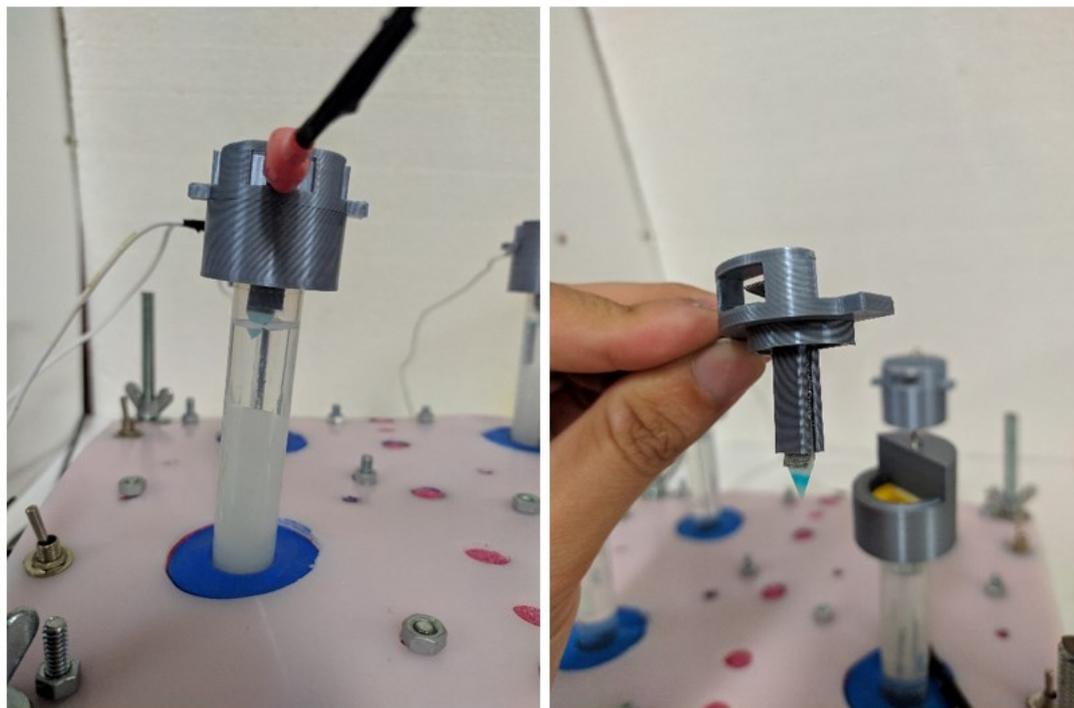


Figura 17 - Prova de conceito visual do sistema de eletroextração com corante azul de metileno. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 min; fase doadora composta por 7 mL mistura 1:1 (v/v) de acetonitrila em tampão McIlvaine pH 3; acetonitrila 1:1 (v/v); filtro orgânico composto por 5,25 de 1-octanol; fase aceptora constituída de papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 μL de ácido acético 400 mmol L^{-1} (n = 3).

Dessa forma, pôde-se comprovar o funcionamento do sistema para extração de substâncias catiônicas, usando papel cromatográfico como suporte para o eletrólito da fase aceptora. A Figura 19 acima apresenta o resultado visual da fase aceptora após o término da extração.

4.5 Triagem das condições de análise no espectrômetro de massas

Os estudos para otimizar as condições operacionais do PS-MS e de extração foram realizados visando atingir os melhores sinais analíticos para as aminas biogênicas. Os valores de massa nominal e do íon precursor $[M+H]^+$ de cada composto estão apresentados na Tabela 17 a seguir.

Tabela 17 - Íons precursores das BA e os respectivos íons produto.

| Composto | Massa Nominal (Da) | [M+M] ⁺ | Transição 1 | Transição 2 |
|----------------|-----------------------|--------------------|-------------|-------------|
| Histamina | 111,15 | 112,06 | 95,02 | 68,00 |
| Putrescina | 88,15 | 89,05 | 72,02 | - |
| Cadaverina | 102,18 | 103,08 | 86,04 | - |
| Tiramina | 137,18 | 138,09 | 121,00 | 77,00 |
| Triptamina | 160,22 | 161,13 | 144,03 | 117,00 |
| Feniletilamina | 121,18 | 122,08 | 105,02 | 77,00 |
| Agmatina | 130,19 | 131,00 | 72,02 | - |
| Espermina | 202,34 | 203,00 | 112,00 | 129,00 |
| Espermidina | 145,25 | 146,00 | 103,00 | 72,00 |

Os espectros de massas foram obtidos inicialmente nos modos positivo e negativo, porém, constatou-se, como esperado para bases orgânicas, que apenas no modo positivo os sinais dos íons precursores dos analitos protonados estudados foram identificados, como ilustrado na Figura 18. Dessa forma, todos os espectros de massas foram obtidos somente no modo positivo.

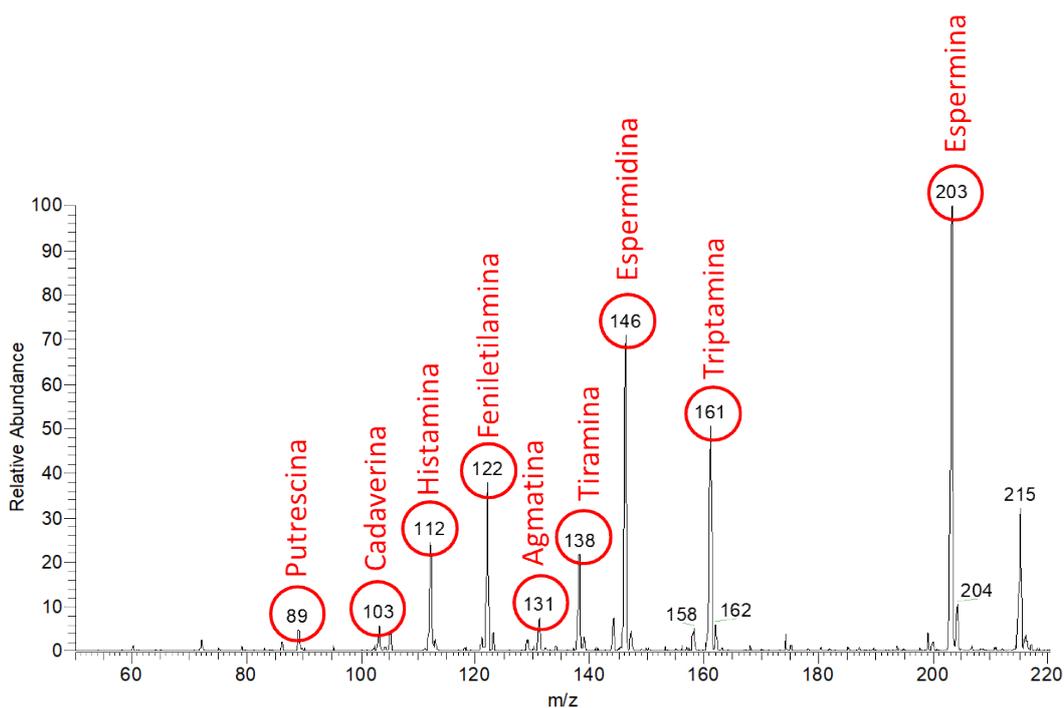
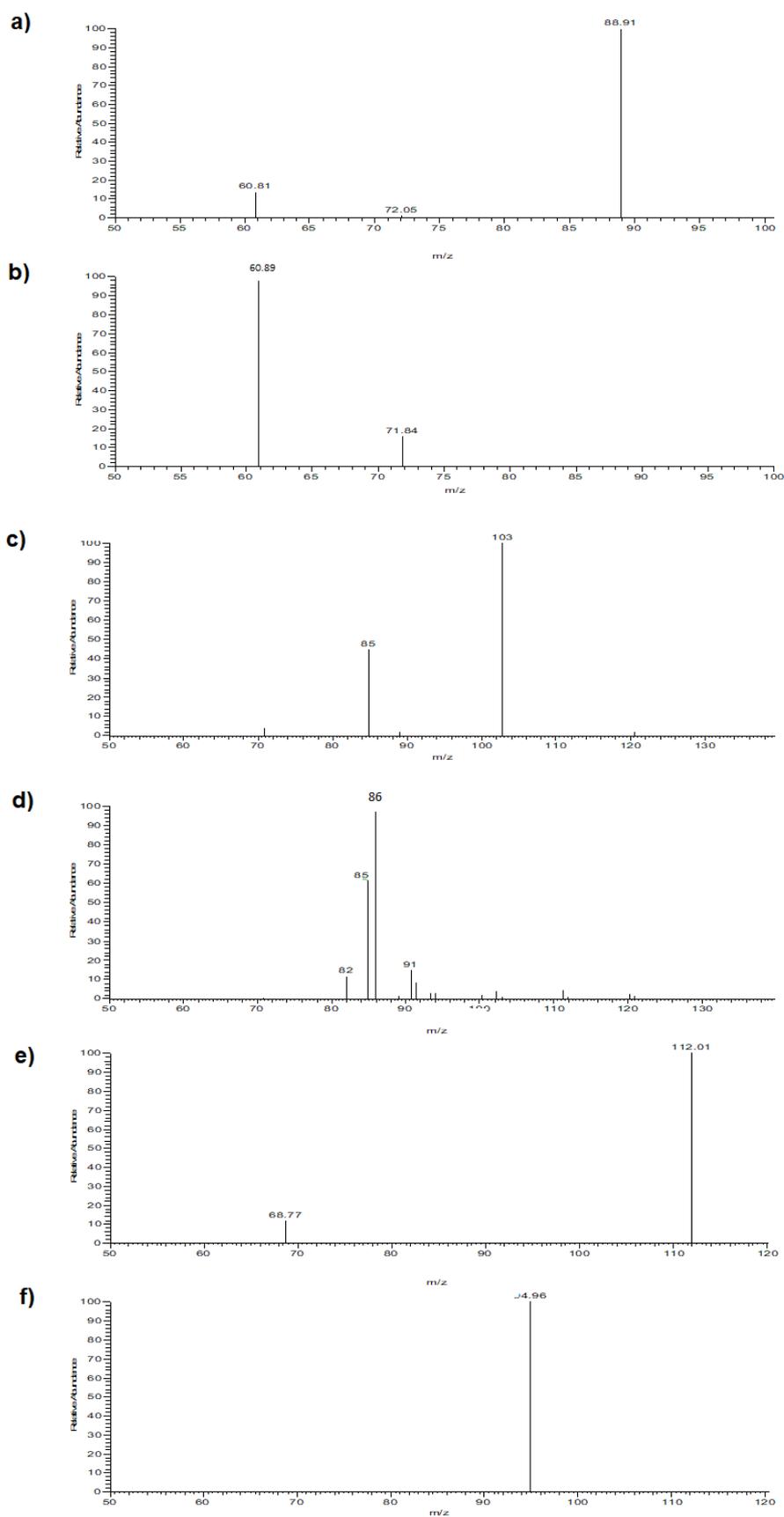
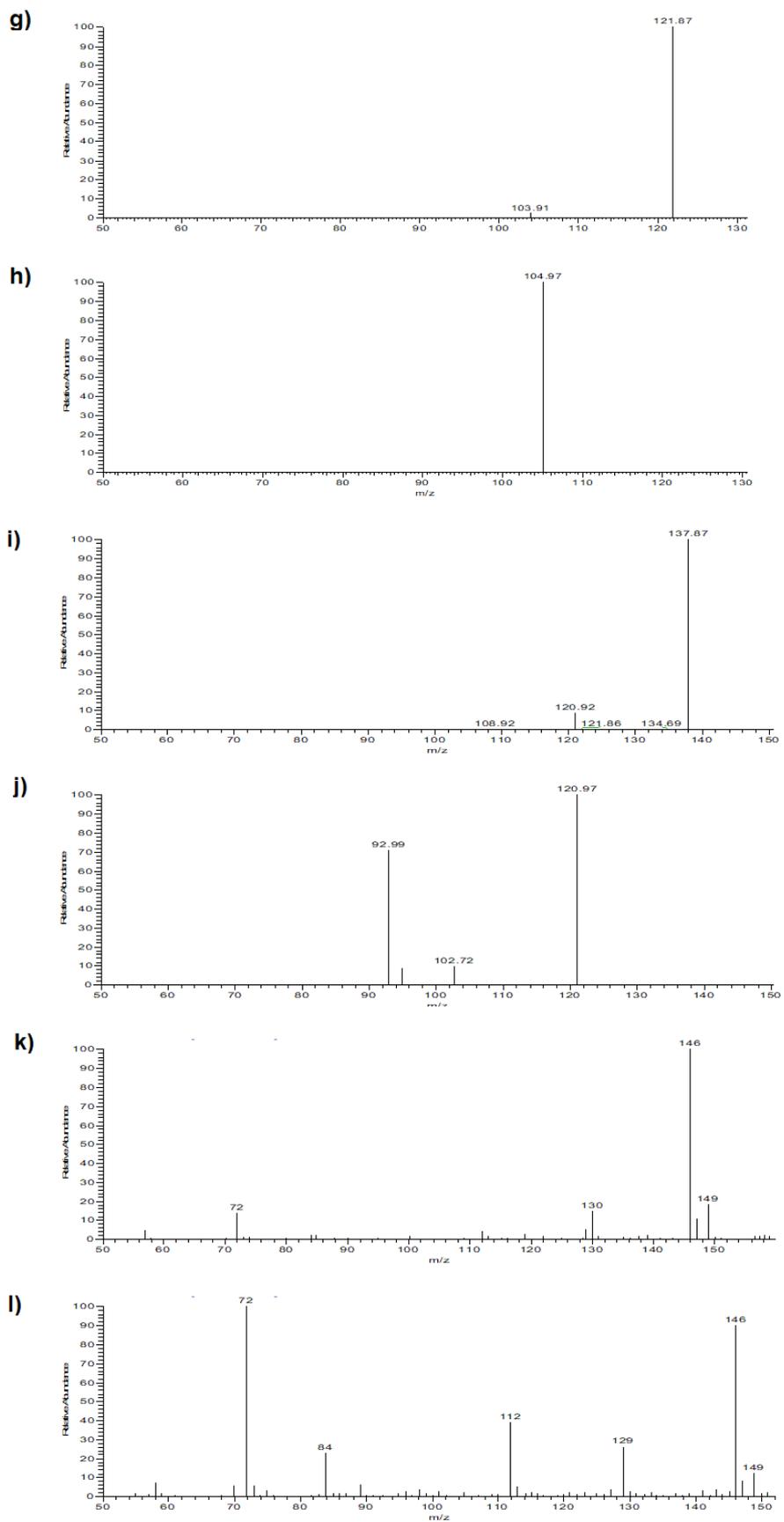


Figura 18 - Íons precursores das BA protonadas obtidas no modo positivo por PS-MS.

Para confirmar se os íons precursores m/z 89, 103, 112, 122, 131, 138, 146 e 161 eram pertencentes respectivamente aos analitos putrescina, cadaverina, histamina, feniletilamina, agmatina, tiramina, espermidina e triptamina, realizou-se a fragmentação desses íons ilustrados na Figura 19, abaixo.





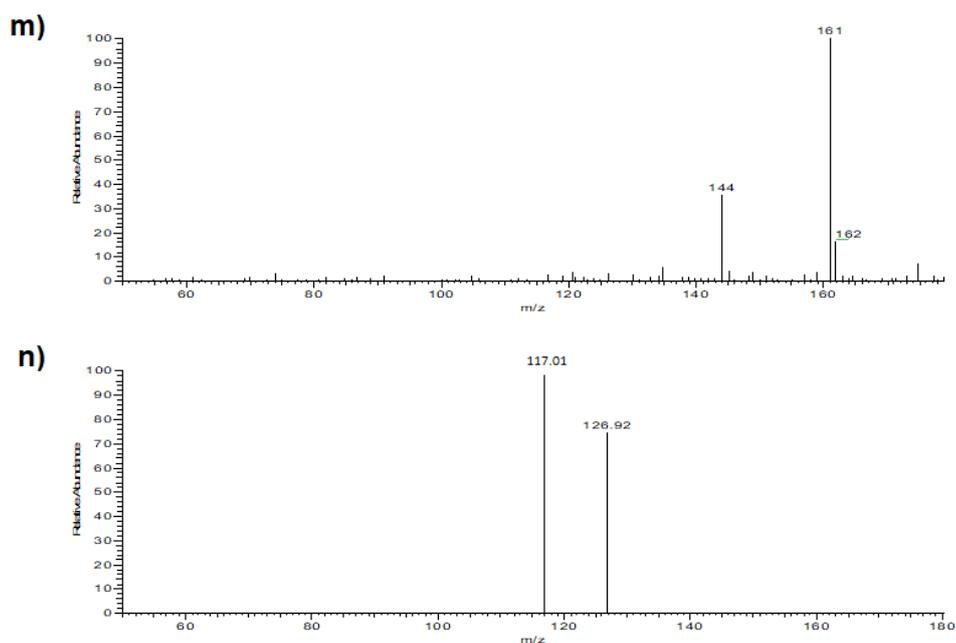


Figura 19 - a) Espectro referente à putrescina. b) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à putrescina. c) Espectro referente à cadaverina. d) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à cadaverina. e) Espectro referente à histamina. f) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à histamina. g) Espectro referente à feniletilamina. h) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à feniletilamina. i) Espectro referente à tiramina. j) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à tiramina. k) Espectro referente à espermidina. l) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à espermidina. m) Espectro referente à triptamina. n) Íons produtos provenientes da fragmentação referente à triptamina.

A putrescina (íon precursor $m/z = 88,91$) apresentou íon produto de $m/z 71,84$, a cadaverina (íon precursor $m/z = 103,00$) apresentou íon produto de $m/z 86,00$, a histamina (íon precursor $m/z = 112,01$) apresentou íon produto de $m/z 94,96$, a feniletilamina (íon precursor $m/z = 121,87$) apresentou íon produto de $m/z 104,97$, tiramina (íon precursor $m/z = 137,87$) apresentou íon produto de $m/z 120,97$, a espermidina (íon precursor $m/z = 146,00$) apresentou íon produto de $m/z 72,00$, triptamina (íon precursor $m/z = 161,00$) apresentou íon produto de $m/z 117,01$. Os

resultados obtidos foram similares aos apresentados na literatura. (TASEV, 2017; STAVROPOULOU, 2015; LI, 2013).

4.6 Estudo univariado das condições que afetam a eletroextração

Para avaliar os fatores que poderiam afetar a eletroextração, estudos univariados foram conduzidos com posterior análise por PS-MS com o intuito de se obter informações iniciais do sistema, analito e amostra.

O campo elétrico é um fator crucial para se ter uma extração eficiente dos analitos. A Figura 20 apresenta o percentual de BA após o processo de extração onde as barras na cor verde correspondem a amostras que foram submetidas ao campo elétrico e as de cor azul que não foram submetidas a campo elétrico.

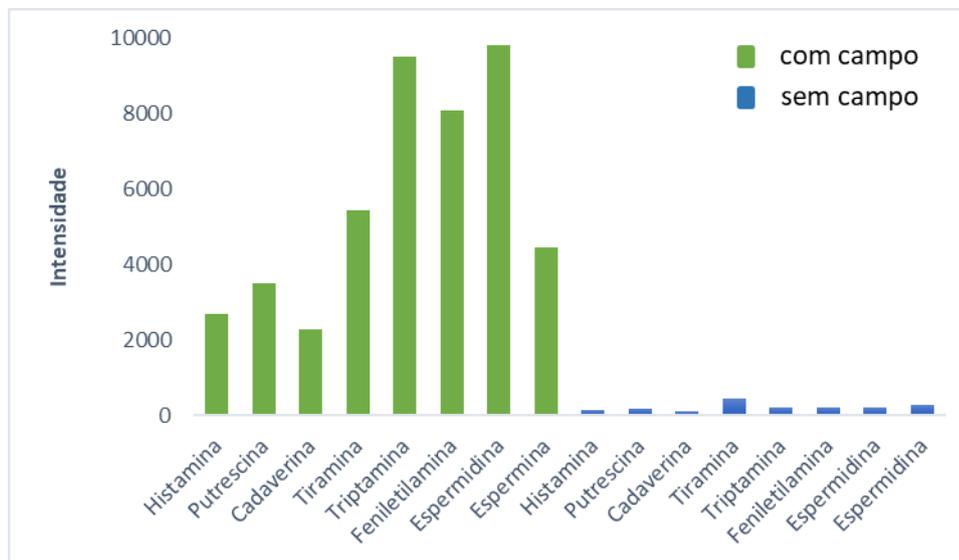


Figura 20 - Influência do campo elétrico na eletroextração dos analitos da fase doadora para a fase aceptora. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 min; fase doadora composta por 7 mL mistura 1:1 (v/v) de acetonitrila em tampão McIlvaine pH 3: acetonitrila 1:1 (v/v); filtro orgânico com-posto por 5,25 de 1-octanol; fase aceptora constituída de papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 µL de ácido acético 400 mmol L⁻¹ (n = 3).

Pode-se observar através dos resultados obtidos que a aplicação da diferença de potencial elétrico entre as fases doadora e aceptora foi determinante para a migração dos analitos para a fase aceptora e uma contribuição muito pequena pelos processos de difusão e partição sem aplicação do campo. Logo, a aplicação do campo elétrico tem uma influência direta na extração das aminas, resultando em sua migração da fase doadora (polo positivo) para a fase aceptora (polo negativo).

Outra condição estudada foi a do papel cromatográfico, foi feita uma comparação do formato e espessuras diferentes. Utilizou-se o PS-MS para identificar qual a melhor espessura de papel cromatográfico, comparando os sinais médios de 5 *scans* da análise de uma mistura de BA extraídas, como representado na Figura 21. Pode-se concluir nessa comparação que o papel cromatográfico do tipo 3MM Chr que é mais espesso obteve melhores resultados em comparação com o papel cromatográfico 1 Chr, isso pode ser devido a sua maior capacidade de absorção por ter camadas. Outro resultado interessante desse experimento foi que o papel cromatográfico triangular retangular é melhor, por utilizar uma malha de ferro envolta do papel durante a análise, a distribuição do potencial elétrico será mais eficiente no papel, ionizando mais facilmente os analitos até a fonte do espectrômetro de massas.

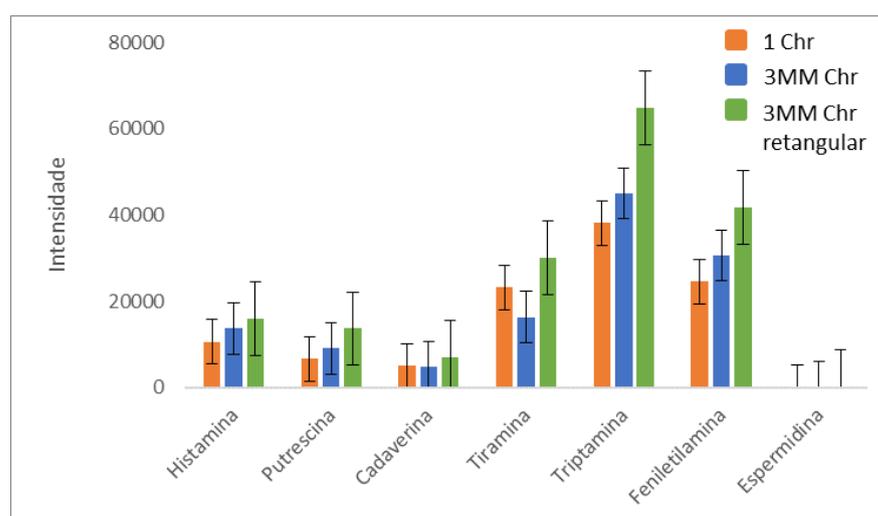


Figura 21 – Comparação do papel cromatográfico em diferentes espessuras (1Chr e 3MM Chr) e em diferentes formatos. As condições de extração foram: diferença de potencial de

300 V aplicado durante 10 min; fase doadora composta por 8 mL de BA 1 mg.L⁻¹ em tampão: ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico constituído de 4 mL de 1-octanol; fase aceptora composta por papel cromatográfico com 70 µL de HAc 400 mmol L⁻¹.

4.7 Planejamento Box-Behnken para otimização das condições de eletroextração

Esse planejamento foi usado para otimização de 3 fatores (potencial elétrico, tempo de aplicação, teor de acetonitrila), que foram avaliados em três níveis para feniletilamina, triptamina e espermidina como analitos de referência. Outros trabalhos já demonstraram que esses três fatores são de grande influência na eletroextração (AVELAR, 2020). A fim de encontrar um compromisso entre essas variáveis e o percentual de acetonitrila na fase doadora, otimizou-se esses fatores através do planejamento Box-Behnken. A significância da regressão e a falta de ajuste foram avaliadas pela ANOVA, cujos parâmetros estão dispostos na Tabela 18.

| FV | SQ | GL | MQ | F | p | |
|----------------------|-----------|----|-----------|--------|----------|-------------------|
| Modelo | 1,920E+05 | 6 | 32003,73 | 20,73 | < 0.0001 | Significativo |
| A-Potencial elétrico | 1,074E+05 | 1 | 1,074E+05 | 69,53 | < 0.0001 | |
| B-Tempo | 20482,88 | 1 | 20482,88 | 13,26 | 0,0045 | |
| C-Acetonitrila | 1705,28 | 1 | 1705,28 | 1,10 | 0,3181 | |
| AB | 22350,25 | 1 | 22350,25 | 14,47 | 0,0035 | |
| AC | 234,09 | 1 | 234,09 | 0,1516 | 0,7052 | |
| BC | 39880,09 | 1 | 39880,09 | 25,83 | 0,0005 | |
| A ² | 15441,80 | 10 | 1544,18 | | | |
| B ² | 8581,99 | 6 | 1430,33 | 0,8340 | 0,5996 | |
| C ² | 6859,81 | 4 | 1714,95 | | | |
| Resíduo | 2,075E+05 | 16 | | | | |
| Falta de ajuste | 1,920E+05 | 6 | 32003,73 | 20,73 | < 0.0001 | Não significativo |
| Erro puro | 1,074E+05 | 1 | 1,074E+05 | 69,53 | < 0.0001 | |
| Total | 20482,88 | 1 | 20482,88 | 13,26 | 0,0045 | |

Tabela 18 - Parâmetros da ANOVA para a Feniletilamina.

O modelo adotado foi o 2FI (interação de dois fatores), onde o valor F do modelo de 20,73 implica que o modelo é significativo. Existe apenas uma chance de 0,01% de que o valor F possa ocorrer devido a ruído. Valores de P inferiores a 0,0500 indicam que os termos do modelo são significativos. Neste caso, A, B, AB, BC são termos de modelo significativos. Valores maiores que 0,1000 indicam que os termos do modelo não são significativos.

As superfícies de resposta e os diagramas de contorno obtidas a partir desse modelo estão ilustrados na Figura 22-24, em que se refere ao potencial versus o tempo.

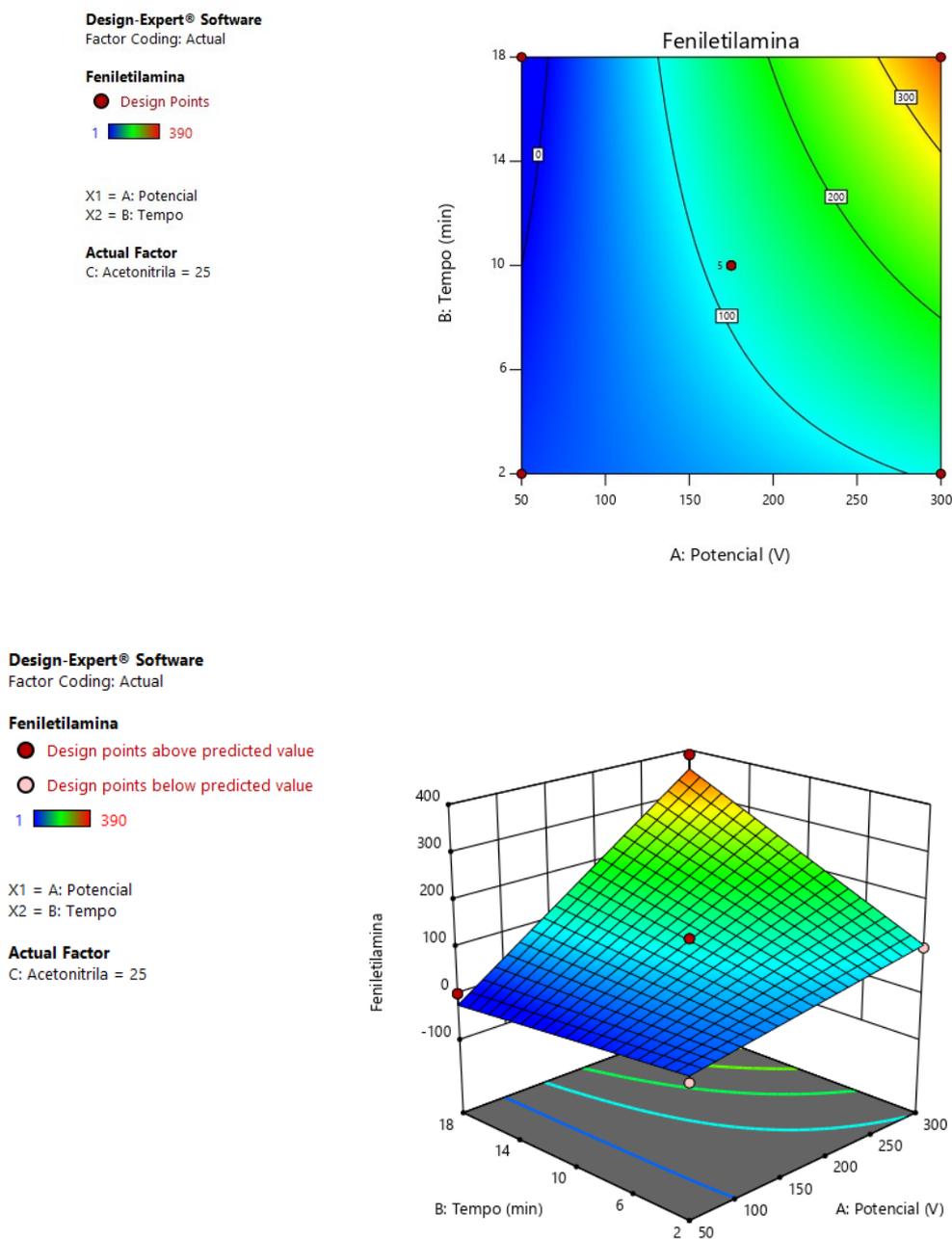


Figura 22 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para potencial e o tempo na otimização dos parâmetros da eletroextração para a feniletilamina.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Feniletilamina

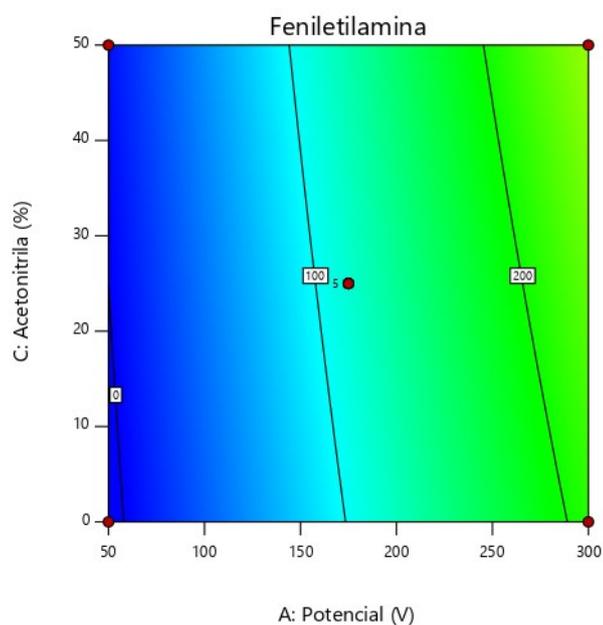
● Design Points

1  390

X1 = A: Potencial
X2 = C: Acetonitrila

Actual Factor

B: Tempo = 10



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Feniletilamina

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

1  390

X1 = A: Potencial
X2 = C: Acetonitrila

Actual Factor

B: Tempo = 10

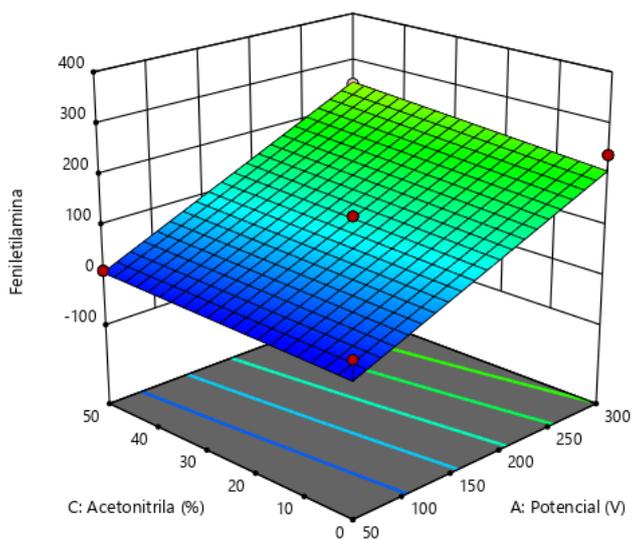


Figura 23 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para potencial e acetonitrila na otimização dos parâmetros da eletroextração para a feniletilamina.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Feniletilamina

● Design Points

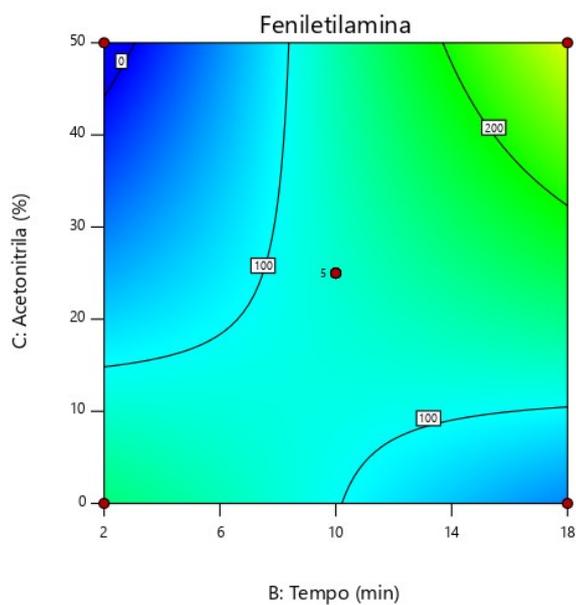
1  390

X1 = B: Tempo

X2 = C: Acetonitrila

Actual Factor

A: Potencial = 175



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Feniletilamina

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

1  390

X1 = B: Tempo

X2 = C: Acetonitrila

Actual Factor

A: Potencial = 175

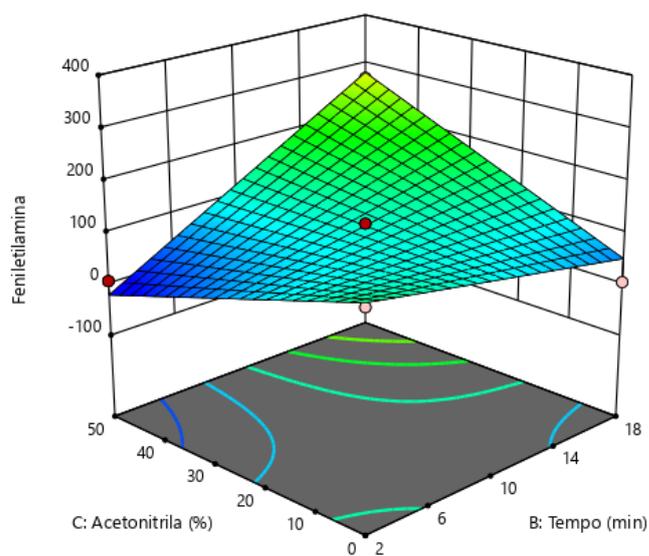


Figura 24 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para tempo e acetonitrila na otimização dos parâmetros da eletroextração para a feniletilamina.

Através das superfícies de resposta, nota-se o efeito significativo e negativo do potencial aplicado, sendo obtidas melhores respostas quando o potencial ficou em torno de 300 V e o tempo em torno de 18 min. O uso de voltagens e tempos maiores resultam em um aumento da resposta. Os parâmetros da ANOVA para a triptamina e a feniletilamina estão no Anexo A.

4.8 Otimização das condições de análise no espectrômetro de massas através do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

O planejamento fatorial envolve as combinações entre os níveis de dois ou mais fatores. Então, se todas as interações entre todos os níveis forem consideradas, tem-se um planejamento fatorial completo. Através desse planejamento, é possível estudar fatores de um determinado processo. Os estudos fracionados são interessantes quando há muitos fatores e se deseja conhecer quais são os efeitos significativos.

Nesse planejamento a significância dos efeitos foi calculada através do teste t de student. Esse teste considera o parâmetro analisado como o menor nível de significância, na utilização do teste de hipótese e na avaliação de quais fatores ou interações entre eles são significativos. Após a definição dos fatores significativos, utilizou-se o método de superfície de resposta para otimizar o procedimento, ou seja, encontrar a região onde há os maiores valores da resposta de interesse.

Empregando ANOVA (Tabela 19), o valor F do modelo de 10,15 implica que o modelo é significativo. Há apenas uma chance de 4,33% de que um valor F tão grande possa ocorrer devido ao ruído. Valores de P inferiores a 0,0500 indicam que os termos do modelo são significativos. Neste caso a voltagem do papel (B), e a temperatura do capilar (C) são termos de modelo significativos. Valores maiores que 0,1000 indicam que os termos do modelo não são significativos.

Tabela 19 - Parâmetros da ANOVA para a feniletilamina.

| FV | SQ | GL | MQ | F | p | |
|--------------------------|-----------|----|-----------|-------|--------|---------------|
| Modelo | 4,079E+08 | 4 | 1,020E+08 | 10,15 | 0,0433 | significativo |
| A-Distância | 1,616E+07 | 1 | 1,616E+07 | 1,61 | 0,2943 | |
| B-Voltagem no papel | 1,855E+08 | 1 | 1,855E+08 | 18,46 | 0,0232 | |
| C-Temperatura do capilar | 1,696E+08 | 1 | 1,696E+08 | 16,88 | 0,0261 | |
| D-Voltagem do capilar | 3,663E+07 | 1 | 3,663E+07 | 3,64 | 0,1523 | |
| Resíduo | 3,015E+07 | 3 | 1,005E+07 | | | |
| Total | 4,381E+08 | 7 | | | | |

Nos gráficos de Pareto da Figura 25 são apresentados os resultados da otimização dos parâmetros de espectrometria de massas pelo planejamento fracionário 2^{4-1} para as aminas biogênicas (nível de confiança 95%). As barras acima da linha representam fatores que são considerados significativos, e aqueles abaixo não são significativos.

Design-Expert® Software

Feniletilamina

A: Distância
 B: Voltagem no papel
 C: Temperatura do capilar
 D: Voltagem do capilar

Positive Effects
 Negative Effects

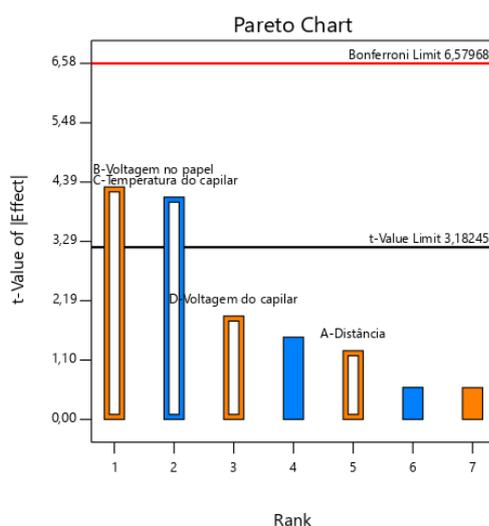


Figura 25 - Gráfico de Pareto para a feniletilamina. 1) Voltagem no papel. 2) Temperatura do capilar. 3) Voltagem do capilar. 4) Distância e temperatura do capilar. 5) Distância. 6) Distância e voltagem do capilar. 7) Distância e voltagem no papel.

Embora os analitos tenham estruturas semelhantes, o modelo não foi significativo para todos, adotando esse modelo como o resultado padrão para as aminas biogênicas. Logo, os valores adotados para os fatores comuns aos analitos estão dispostos na Tabela 20 a seguir, a distância e a voltagem do capilar foram estabelecidas em 3 mm e 26 V, pois não foram significativos.

Tabela 20 - Parâmetros adotados para análise por PS-MS.

| Variável | Valor adotado |
|-----------------------------|----------------------|
| Distância (mm) | 3 |
| Voltagem no papel (kV) | 4 |
| Temperatura do capilar (°C) | 250 |
| Voltagem do capilar (V) | 26 |

4.9 Comparação entre amostras fortificadas de solução tampão, leite e vinho como fase doadora

Foram comparados os resultados de eletroextração de amostras de leite (1:5, v/v), vinho branco e tinto (1:1, v/v) e solução tampão McIlvaine pH 3: acetonitrila 1:1 (v/v). As amostras de leite:H₂O (1:1 v/v) e leite:H₂O (1:2 v/v) não foram analisadas pelo PS-MS devido ao elevado residual proteico que ficou na amostra. Já para as amostras de leite (1:5 v/v), vinho branco (1:1 v/v) e vinho tinto (1:1 v/v), possivelmente ocorreram perdas de alguns analitos que pode ser devido à precipitação proteica ou a possíveis efeito de matriz (Figura 26).

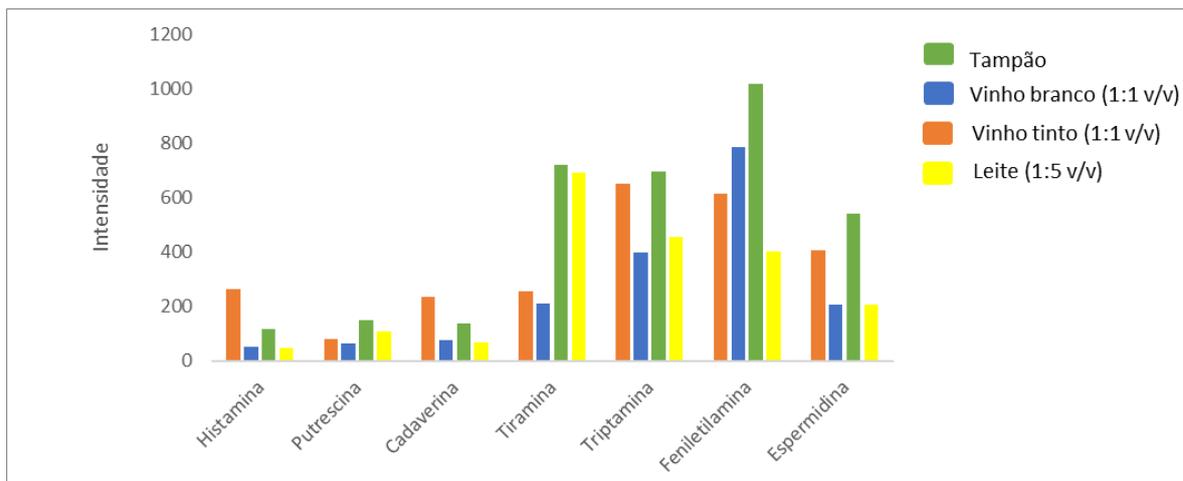


Figura 26 - Comparação entre as matrizes de análise. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 min; fase doadora composta por 7 mL mistura 1:1 (v/v) de acetonitrila em tampão McIlvaine pH 3; acetonitrila 1:1 (v/v); filtro orgânico com-posto por 5,25 de 1-octanol; fase acceptora constituída de papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 μ L de ácido acético 400 mmol L⁻¹ (n = 3).

4.10 Derivatização com cloreto de dansila (DBS-Cl) e identificação por PS-MS

Na literatura podemos encontrar diversos protocolos de derivatização, onde encontramos processos com temperaturas, formas de aquecimento e tempos de reação diferentes, soluções saturadas de carbonato ou bicarbonato de sódio, dentre outros parâmetros (ZARGHAMPOUR, 2018). A temperatura é um dos parâmetros mais importantes, uma vez necessita-se de altas temperaturas para se ter a reação de derivatização, porém, valores muito elevados podem causar decomposição das BA. Outro parâmetro de extrema importância é o pH, é relatado na literatura a utilização de uma solução saturada de sal, sendo as mais utilizadas a solução de carbonato de sódio ou de bicarbonato de sódio (SAGRATINI, 2012; CAO, 2019).

Com o intuito de se obter um método sensível e reprodutível para a detecção e quantificação das BA, realizou-se à otimização de vários parâmetros em vial, onde variamos as condições representadas na Tabela 13. O melhor resultado obtido está

representado na Figura 28, onde a solução derivatizada em um vial foi levada para uma estufa a 60°C por 15 minutos, a basificação com bicarbonato de sódio (pH = 9) obteve melhor resultado para essa reação.

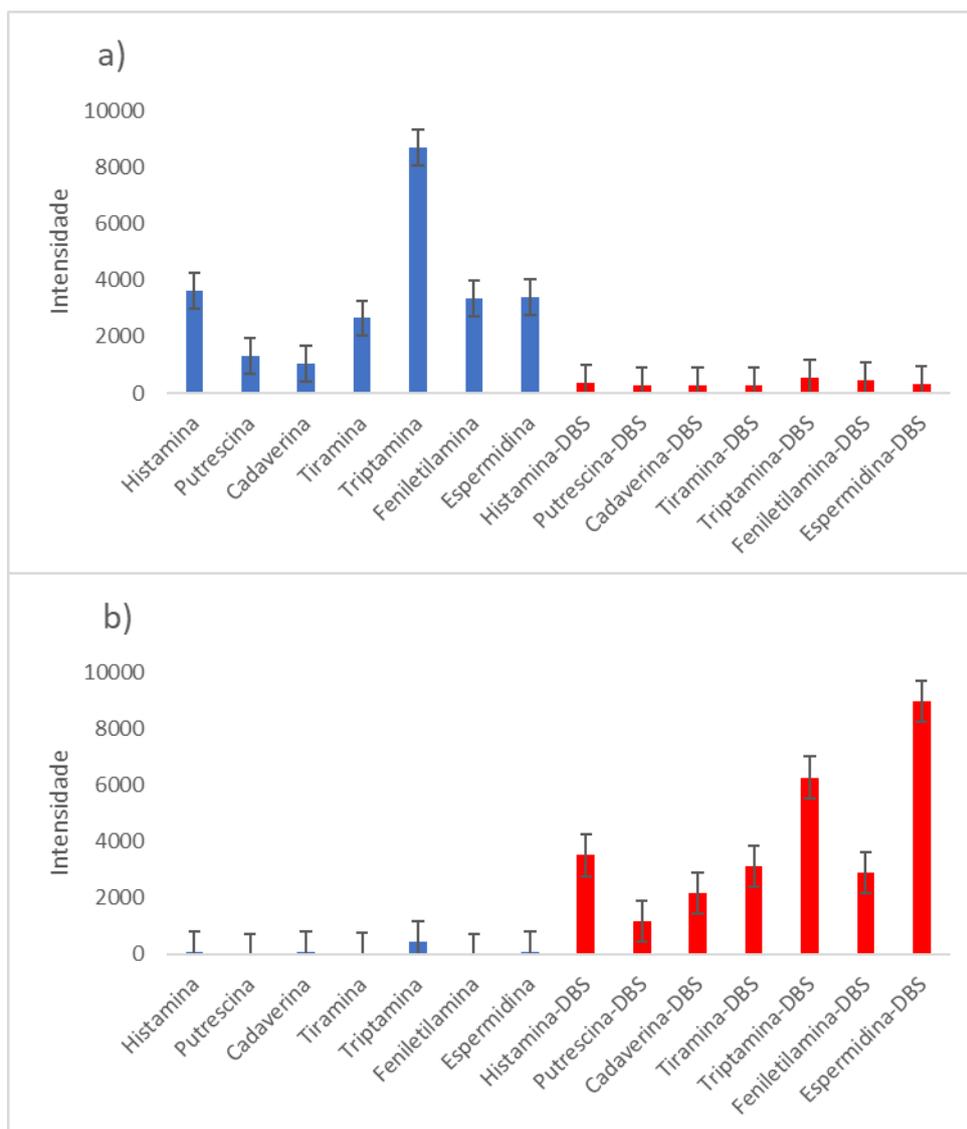


Figura 27 - Análise por PS-MS de 10 mg L⁻¹ das aminas biogênicas. b) Análise por PS-MS do processo otimizado de derivatização com cloreto de dansila para as aminas biogênicas.

Após a definição da melhor metodologia, tentou-se realizar diretamente sobre o papel a etapa derivatização com o intuito de facilitar o procedimento. Para tanto utilizou-se uma câmara de luz quanto uma estufa, como apresentado na Figura 28.

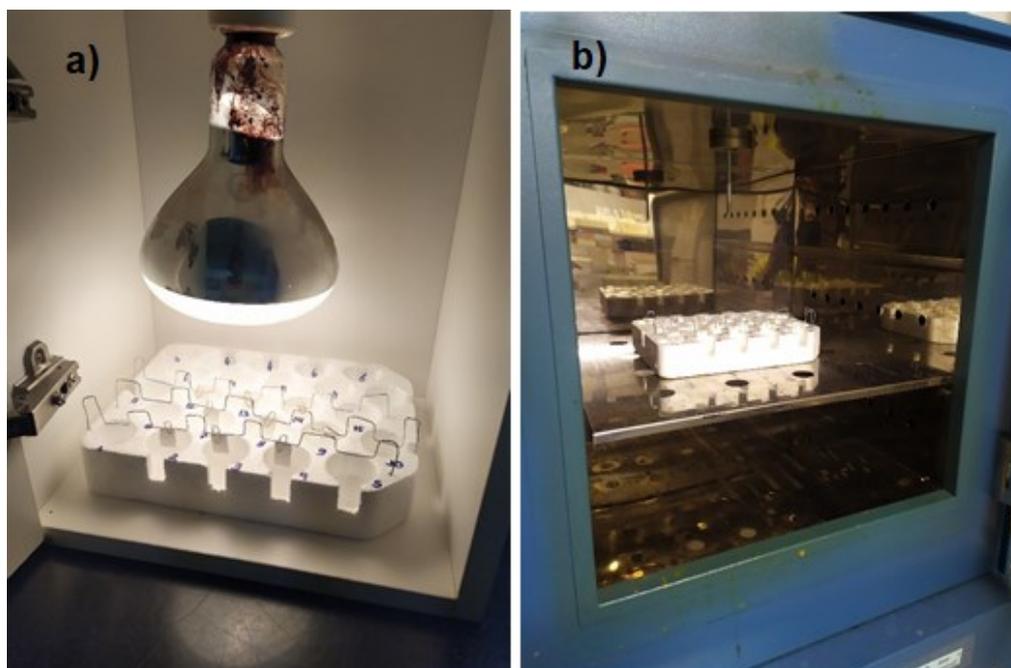


Figura 28 - Processo de derivatização no papel utilizando uma câmara de luz IV. b) Processo de derivatização do papel utilizando uma estufa a 60°C. Os parâmetros de derivatização foram: pool de BA a 10 mg.L⁻¹; o pH variou entre 8 e 9; o tempo ficou em 15, 30 e 60 minutos; a temperatura de trabalho foi de 45, 60 e 75 °C; e o meio de aquecimento foi utilizando uma estufa e uma câmara de infravermelho.

Os resultados do processo de derivatização sobre papel não foram reproduzíveis como aqueles observados no vial, o que pode ser devido a secagem da solução levando a uma degradação das aminas e a não identificação do sinal analítico pelo espectrômetro de massas, como apresentado na Figura 29. Portanto, como o intuito do trabalho é a facilidade de análise e integração do sistema de eletroextração com o PS-MS, optou-se por não realizar a derivatização, pois seria uma etapa demorada e trabalhosa para se realizar após a dessorção e em um vial ou frasco

similar para depois ser transferido novamente para o OS-MS, fugindo do foco do trabalho.

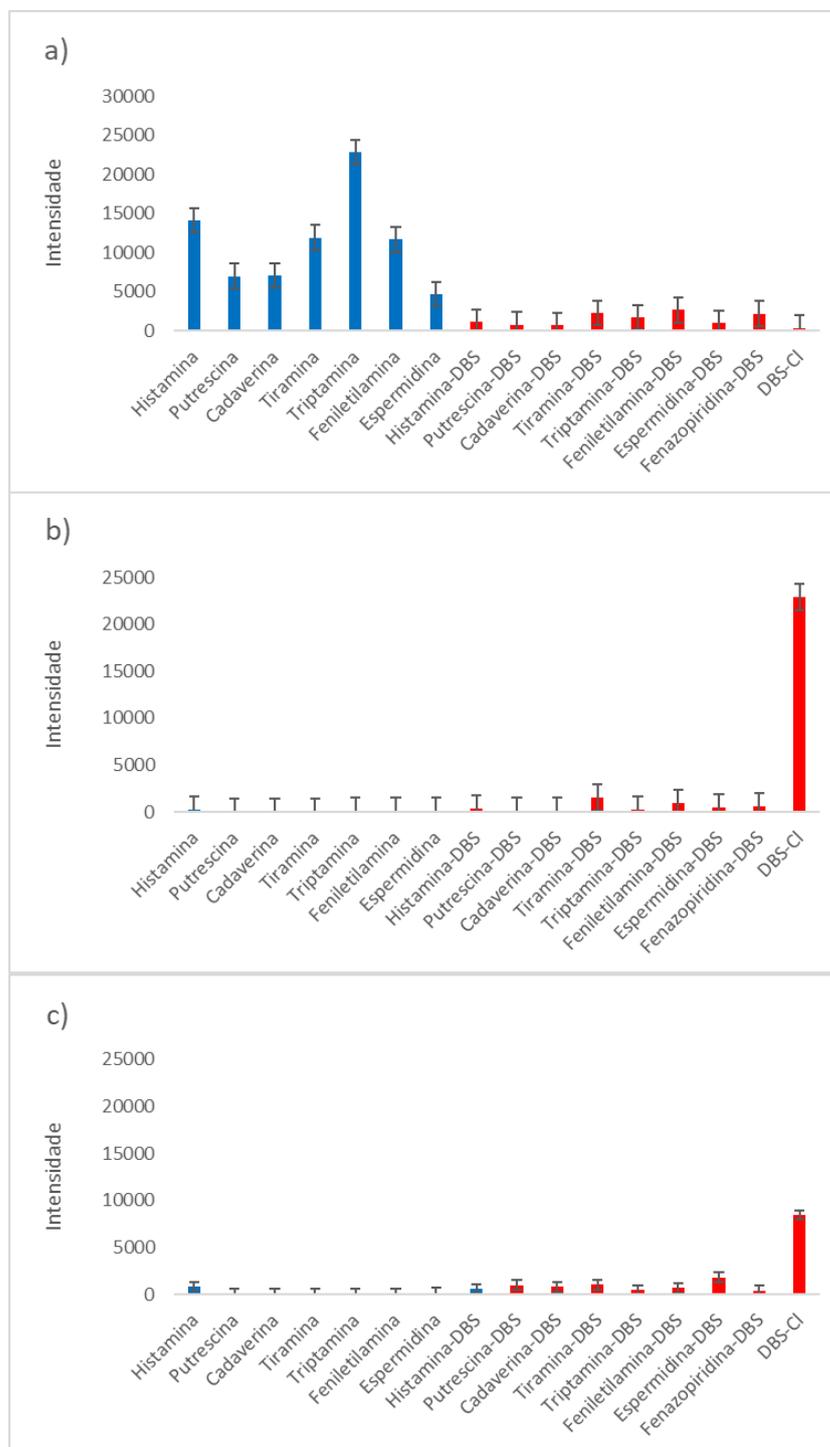
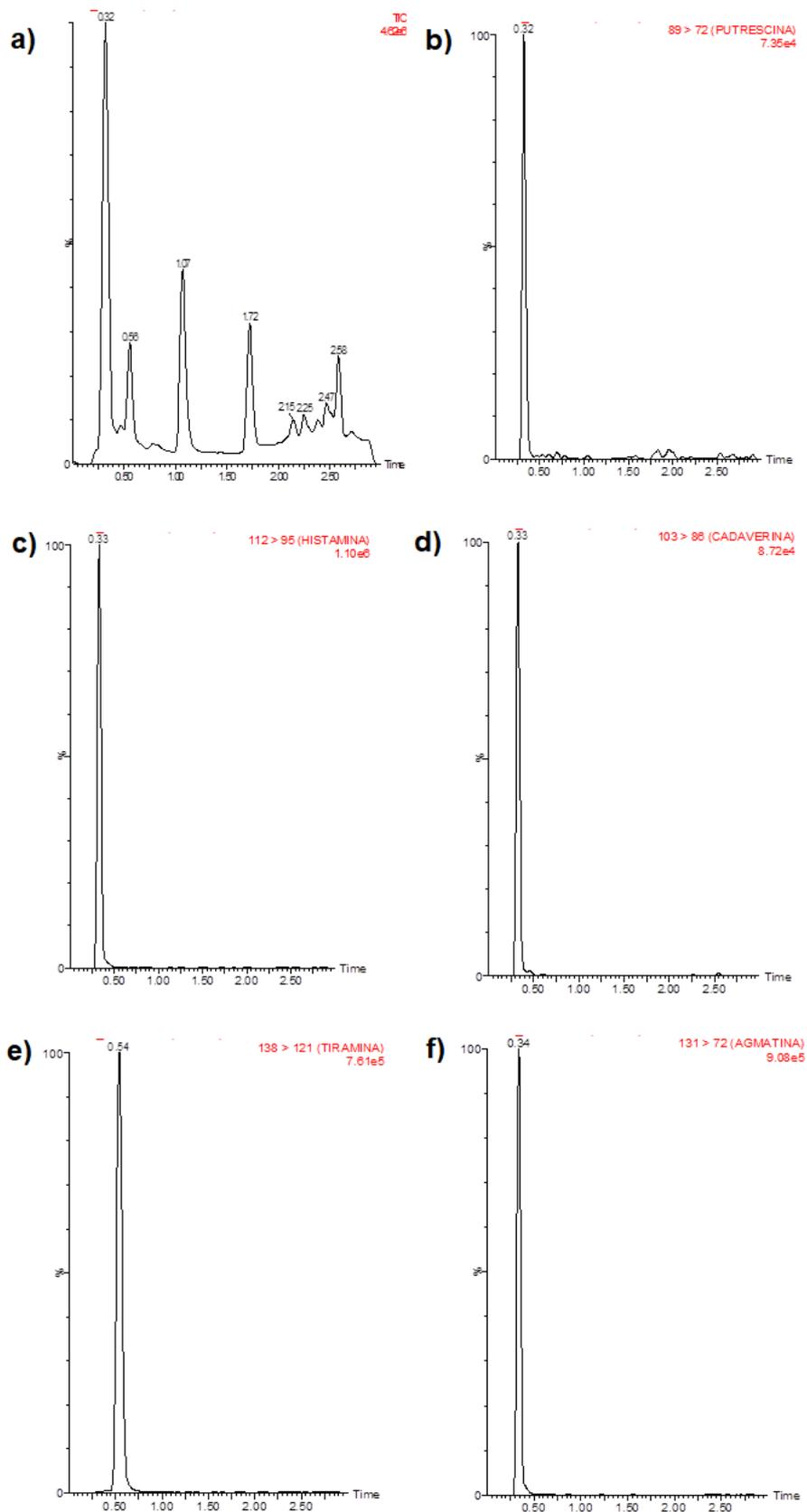


Figura 29 - Análise por PS-MS de 10 mg L⁻¹ das aminas biogênicas. b) Análise por PS-MS do processo de derivatização na estufa com cloreto de dansila para as aminas biogênicas no papel. c) Análise por PS-MS do processo de derivatização na câmara de luz IV com cloreto de dansila para as aminas biogênicas em papel.

4.11 Análise por UHPLC-MS/MS

Com o intuito de comprovar a eficácia do método, utilizou-se uma técnica de referência (UHPLC-MS/MS) para identificação dos analitos deste estudo. Para avaliar uma possível interferência da matriz no processo de eletroextração que invalidasse as otimizações iniciais em solução tampão, comparou-se a performance de extração das aminas biogênicas a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O método foi avaliado observando os cromatogramas das amostras extraídas em tampão, os cromatogramas obtidos pela análise por UHPLC-MS/MS após a extração estão representadas na Figura 30, para cada analito com o seu respectivo tempo de retenção, mostrando a seletividade do método.



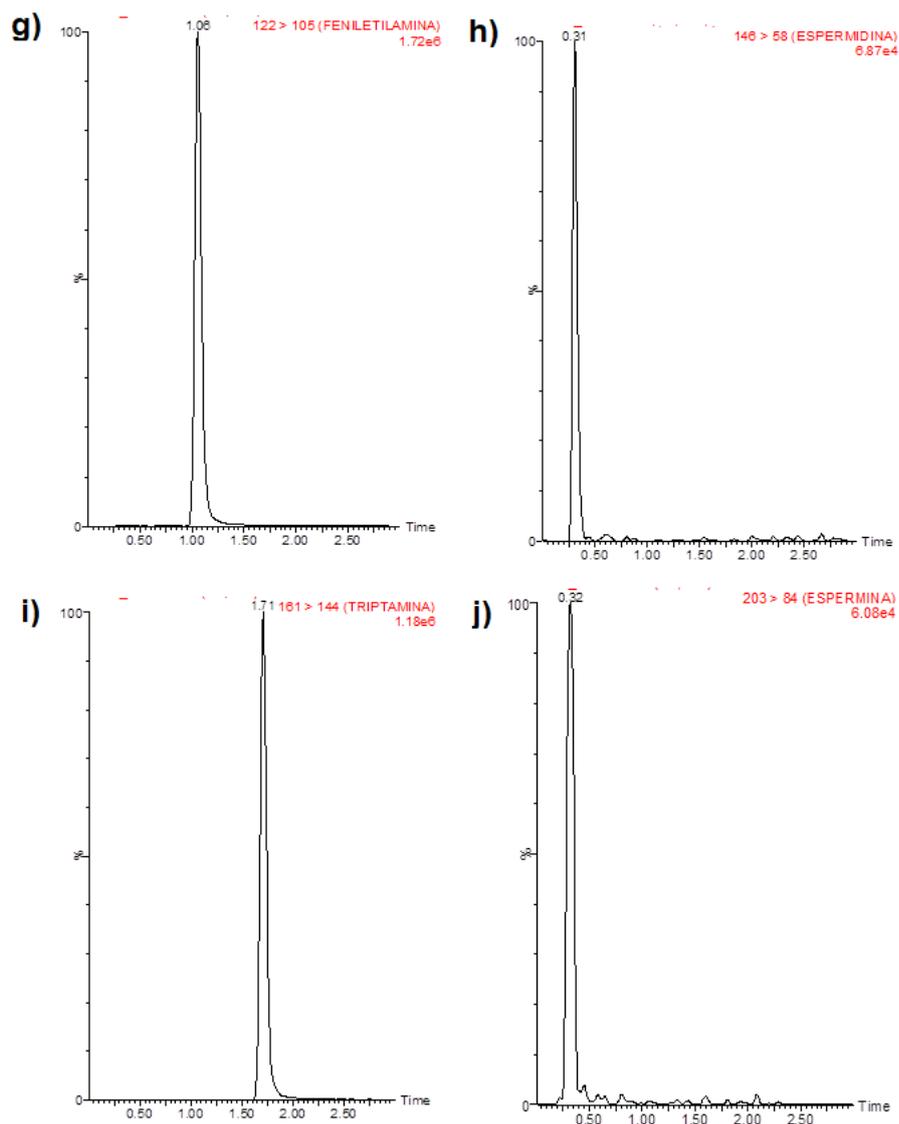


Figura 30 - Cromatogramas das 9 aminas biogênicas a 1 mgL^{-1} após a eletroextração.

Na Figura 30 podemos ver os cromatogramas dos analitos eletroextraídos, na melhor condição. Quanto maior a área dos picos cromatográficos maior será os sinais dos analitos. A relação sinal ruído para todos os analitos ficaram acima de 3:1, como preconizado na literatura (TORRE, 2013).

4.12 Avaliação do tipo e quantidade de solvente na porcentagem de analito desorvido

A Figura 31 apresenta os gráficos que relacionam a intensidade do sinal analítico na extração dos analitos com a mistura utilizada na dessorção para análise no UHPLC-MS/MS:

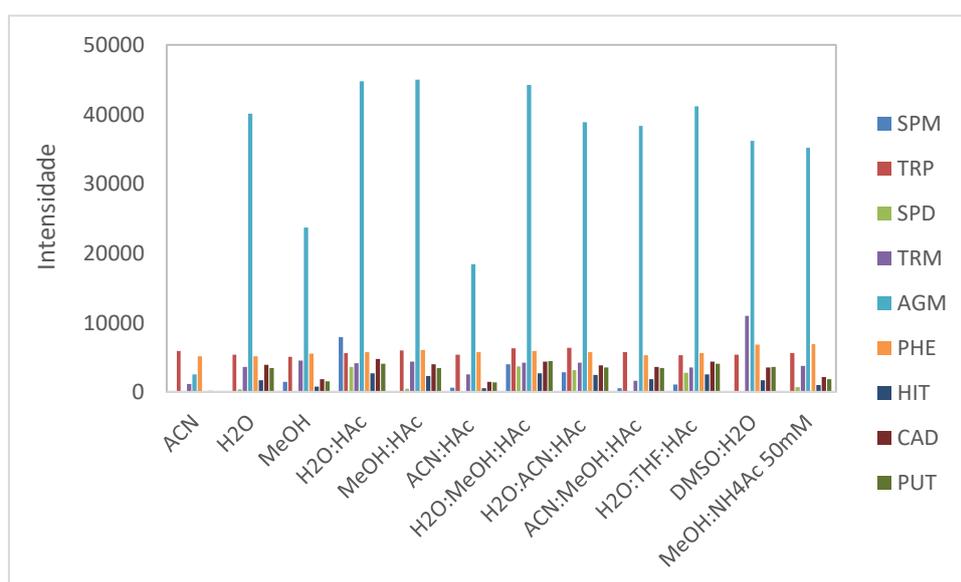


Figura 31 - Resposta dos analitos a 1 mg.L⁻¹ extraídos em diferentes soluções.

Nesse experimento a fase doadora, após a eletroextração, também foi analisada para certificar-se que os resultados obtidos na dessorção fossem um reflexo dos diferentes solventes testados e não de algum possível problema na eletroextração. O solvente foi escolhido baseado nos resultados referentes à espermina e espermidina que sofreram grandes alterações na resposta do sinal analítico no UHPLC-MS/MS quando foi variado as soluções de extração. O melhor resultado obtido foi utilizando água com 5% de ácido acético (H₂O:HAc) como apresentado na Figura 32, que apresentou uma grande resposta para a espermidina e a espermina sem abaixar a dos outros analitos estudados.

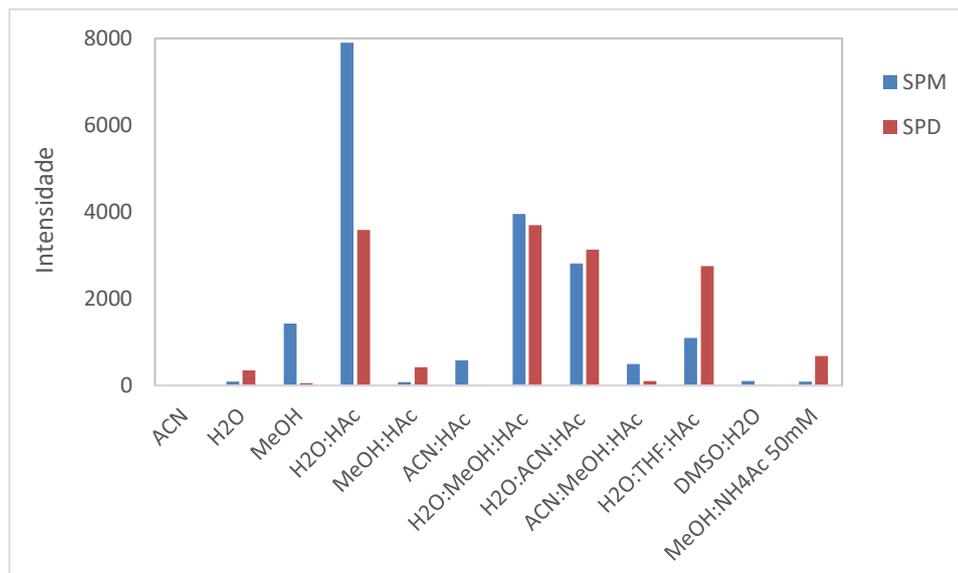


Figura 32 - Resposta da espermidina e espermina em função da variação da composição da solução de desorção. As soluções de trabalho com suas proporções (v/v) são: ACN, H2O MeOH, H2O:HAc (95:5), MeOH:HAc (95:5), ACN:HAc (95:5), H2O:MeOH:HAc (47,5:47,5:5), H2O:ACN:HAc (47,5:47,5:5), MeOH:ACN:HAc (47,5:47,5:5), H2O:THF:HAc (47,5:47,5:5), MeOH:NH4Ac 50 Mm (50:50) e DMSO:H2O (50:50).

4.13 Validação do método Qualitativo

4.13.1 Seletividade

A partir da análise dos cromatogramas da Figura 30, podemos verificar que os picos cromatográficos são estreitos, com boa separação e boa resolução. Os tempos de retenção para cada analito estão representados na Tabela 20.

Por meio da análise da Tabela 21 podemos comprovar a seletividade pelo PS-MS, os íons foram fragmentados com uma energia de colisão variando de 5 a 35 kV. Os padrões apresentavam concentração de 1 mg L^{-1} , e os perfis de fragmentação foram comparados a fim de confirmar se eles, de fato, pertencem ou não às aminas biogênicas. Cada substância apresentou um perfil individual característico de formação de íons produto.

Tabela 21 - Tempo de retenção para os analitos na cromatografia líquida.

| Analito | Tempo de retenção |
|----------------|-------------------|
| Espermidina | 0,31 |
| Espermina | 0,32 |
| Putrescina | 0,32 |
| Histamina | 0,33 |
| Cadaverina | 0,33 |
| Agmatina | 0,34 |
| Tiramina | 0,54 |
| Feniletilamina | 1,06 |
| Triptamina | 1,51 |

A fragmentação dos íons deve ser realizada toda vez que se perceber a presença de picos com a mesma m/z das aminas biogênicas. Devido a complexidade das matrizes é possível que apareçam íons da mesma m/z e a diferenciação deve ser obtida pelos espectros de fragmentação. Entretanto, foram evidenciados cromatogramas livres de interferentes com um perfil distinguível entre as respostas de cada analito, sendo considerados suficientes para determinação da seletividade.

4.13.2 Limite de detecção

Os limites de detecção foram determinados experimentalmente pelo PS-MS reduzindo-se a concentração até onde o sinal dos analitos ainda permanecessem distinguíveis do ruído na relação de 3:1. O LD encontrado para cada analito está

representado pela Tabela 22. Os valores ficaram bem parecidos com de outros trabalhos de determinação de ABs como apresentado por BRUNO (2009). Os valores obtidos mostraram-se bem abaixo dos limites propostos pela legislação vigente de alguns países europeus (Suíça, Áustria, Alemanha, Holanda, Bélgica e França), como por exemplo para a histamina em vinho que corresponde 2 a 10 mg.L⁻¹.

Tabela 22 - Limites de detecção para as aminas biogênicas em estudo.

| Analitos | Faixa de estudo (mg.L⁻¹) | Limite de detecção (mg.L⁻¹) |
|-----------------|--|---|
| Espermidina | 0,01 - 1 | 0,02 |
| Espermina | 0,01 - 1 | 0,02 |
| Putrescina | 0,01 - 1 | 0,20 |
| Histamina | 0,01 - 1 | 0,05 |
| Cadaverina | 0,01 - 1 | 0,20 |
| Agmatina | 0,01 - 1 | 0,10 |
| Tiramina | 0,01 - 1 | 0,05 |
| Feniletilamina | 0,01 - 1 | 0,02 |
| Triptamina | 0,01 - 1 | 0,02 |

4.14 Análises de amostras comerciais

Os teores das aminas encontradas nas amostras analisadas para leite UHT integral, desnatado e semi-desnatado, e vinho tinto e branco estão representadas na Figura 33-34.

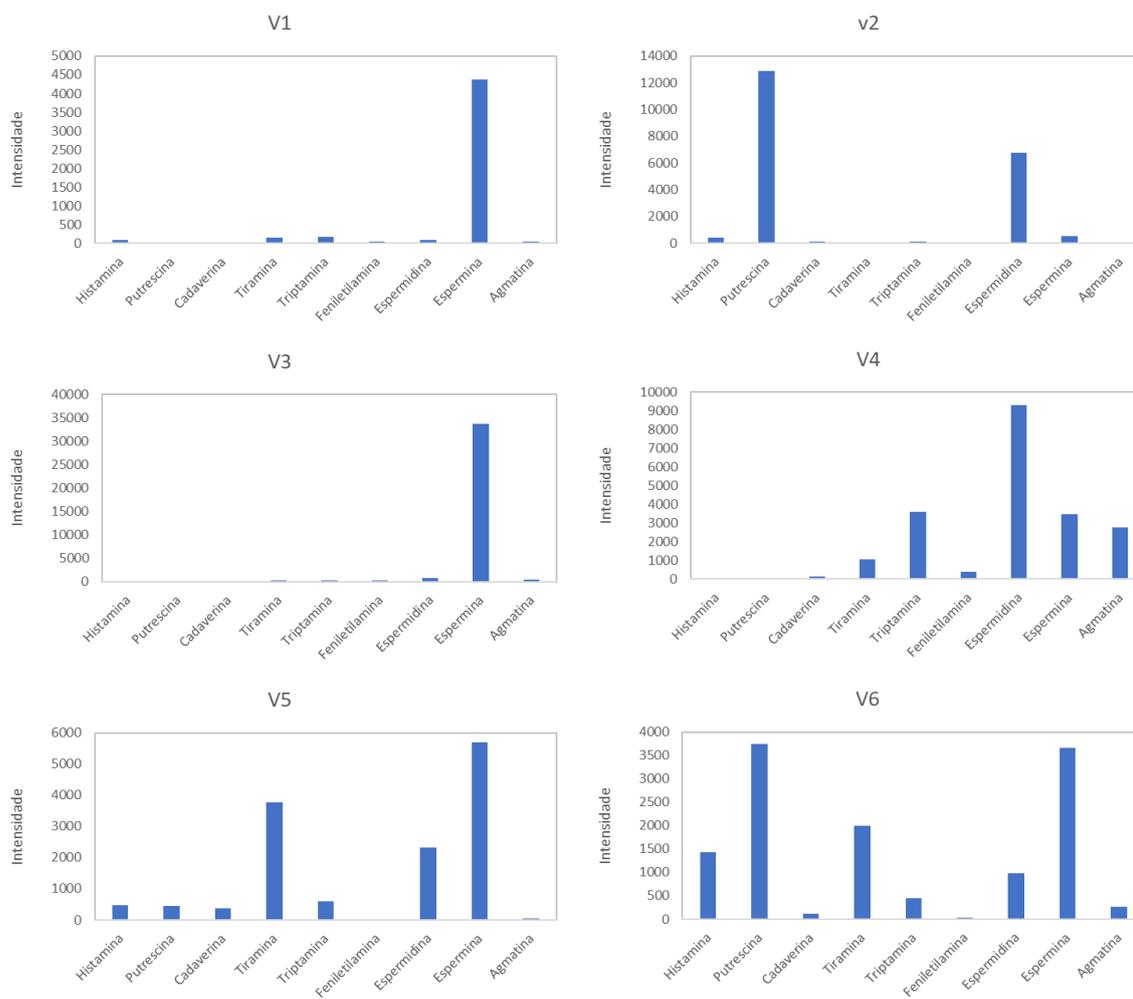


Figura 33 - Sinais das aminas biogênicas em amostras comerciais de vinho.

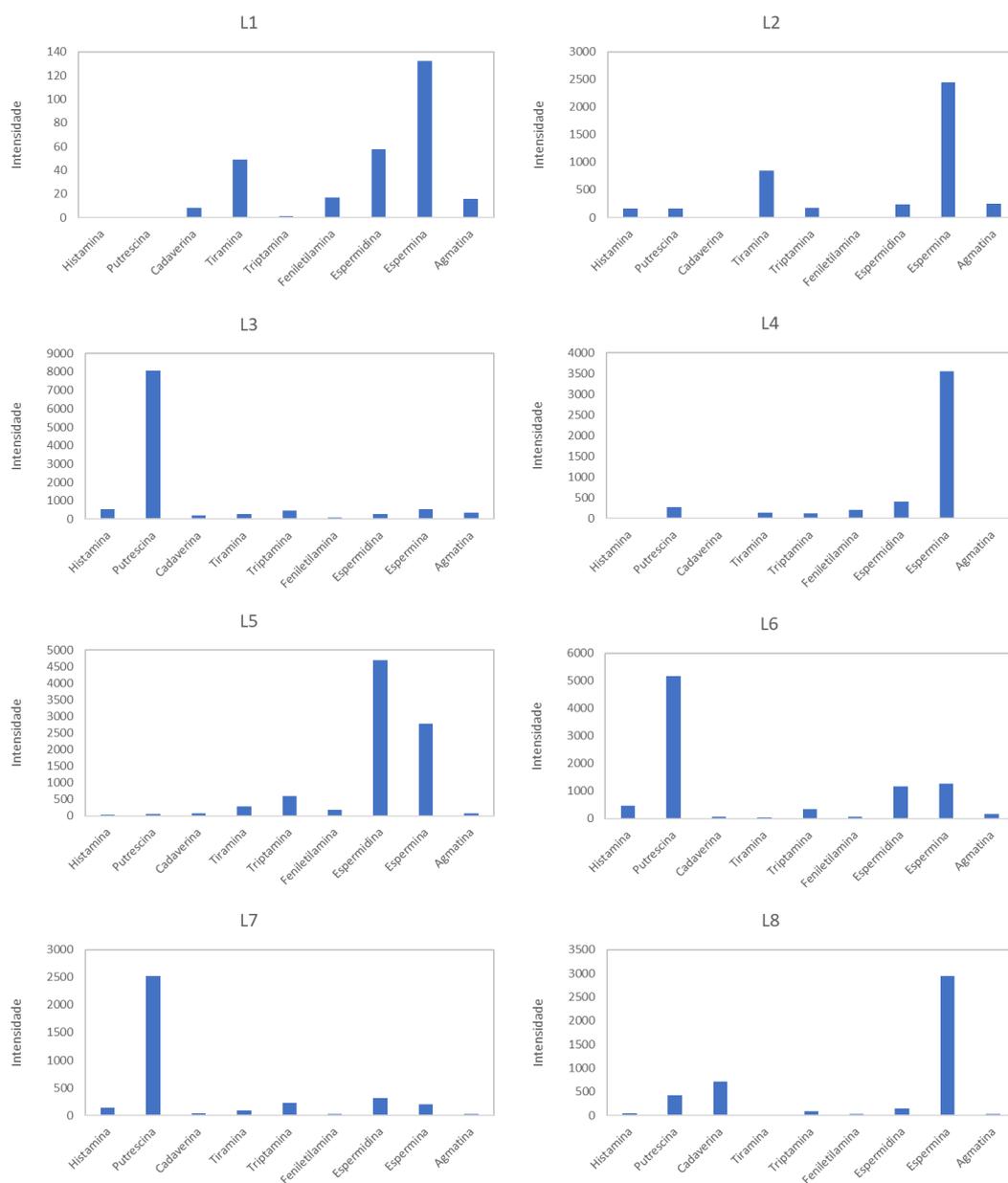


Figura 34 - Sinal das aminas biogênicas em amostras comerciais de leite.

Os resultados obtidos alertam para o fato de um número elevado de amostras parecidas com grande variação dos analitos. As amostras de vinho apresentaram em sua maioria o sinal da espermina, e a histamina que é o principal analito para o vinho não foi identificada para todas as amostras analisadas. Já para as amostras de leite podemos identificar que em todas foram encontrados os analitos de espermidina e espermina, porém em L3, L6 e L7, foram encontrados grandes sinais para a putrescina, podendo indicar o início de deterioração do produto. Em função da origem dos produtos que foram adquiridos, esperava-se uma qualidade alta para a ampla maioria das amostras de leite, pois foram compradas marcas produtos mais caros e outros mais acessíveis, porém todos são renomadas e muito bem estabelecidos no mercado.

5 CONCLUSÕES

Buscou-se desenvolver um dispositivo de impressão 3D que integrasse com o PS-MS para analisar amostras de leite e vinho comerciais que foi avaliado analisando 14 amostras sendo 8 de leite e 6 de vinho.

A rapidez das análises comparada a métodos cromatográficos, faz da PS-MS uma técnica vantajosa e promissora na realização de análise, sendo que cada análise é realizada em poucos segundos. Os resultados apresentados para as abordagens acima foram obtidos facilmente devido à praticidade da eletroextração e do PS-MS, comprovando a eficiência e a confiabilidade do método para fins qualitativos.

O dispositivo impresso em 3D para a fonte de ionização PS-MS demonstrou ser compacta e de fácil manipulação e o processo de adaptação para seu uso é simples, seguro, rápido e não oferece riscos à integridade física do equipamento. A fonte se demonstrou capaz de gerar *sprays* estáveis e realizar a ionização de maneira eficiente.

Para essa técnica de preparo de amostra foi desenvolvido, com materiais de baixo custo e fácil aquisição, um dispositivo multipoços para eletroextração acoplado a um sistema de ajuste e monitoramento da corrente e potencial elétrico. Para conhecimento e domínio do sistema foi de extrema importância um planejamento de experimentos para avaliar parâmetros que influenciam no processo.

Por fim, o dispositivo nas condições otimizadas foi aplicado em amostras comerciais. Foram encontradas predominantemente em todas as amostras de leite as aminas espermidina, espermidina e putrescina. Para as amostras de vinho foram encontradas quase todas as aminas nas amostras, sendo a espermina, putrescina e tiramina as mais encontradas.

Esse trabalho, abre as possibilidades para outras pesquisas na área. Como perspectivas futuras, pode-se melhorar a extração dos analitos. Criar um hardware para fazer a eletroextração simultânea de mais amostras. E realizar uma validação quantitativa completa do método por PS-MS.

REFERÊNCIAS

- AGHAEI, Ali et al. A novel method for the preconcentration and determination of ampicillin using electromembrane microextraction followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of separation science*, v. 42, n. 18, p. 3002-3008, 2019.
- ALTIERI, I. 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.
- ASADI, Sakine; TABANI, Hadi; NOJAVAN, Saeed. Application of polyacrylamide gel as a new membrane in electromembrane extraction for the quantification of basic drugs in breast milk and wastewater samples. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 151, p. 178-185, 2018.
- AVELAR, Millena Christie Ferreira et al. Emprego da eletroextração multifásica para extração de antidepressivos tricíclicos em fluido oral e determinação por UHPLC-MS/MS e PS-MS. 2020. Dissertação de mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2020.
- BACCHI, Matheus Demambre. Análise espacial da produção de leite no Brasil. 2019. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2019.
- BARBOSA, Luisa Carolina. Desenvolvimento de métodos para controle de qualidade de fitoterápicos emagrecedores: Determinação de anorexígenos e constituintes inorgânicos. 2021. Dissertação de mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2021.
- BASURI, Pallab; BAIDYA, Avijit; PRADEEP, Thalappil. Sub-Parts-per-Trillion level detection of analytes by superhydrophobic preconcentration paper spray ionization mass spectrometry (SHPPSI MS). *Analytical chemistry*, v. 91, n. 11, p. 7118-7124, 2019.
- BATTAGLIA, R.; FRÖHLICH, D. HPLC determination of histamine in wine. *Journal of High Resolution Chromatography*, v. 1, n. 2, p. 100-101, 1978.
- BEHPOUR, Majid et al. Combination of gel-electromembrane extraction with switchable hydrophilicity solvent-based homogeneous liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography for the extraction and determination of antidepressants in human serum, breast milk and wastewater. *Journal of Chromatography A*, v. 1621, p. 461041, 2020.
- BOTELHO, Bruno Goncalves. Perfil e teores de aminas bioativas e características físico-químicas em cervejas. 2009. Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2009.

BRAGA, Raquel. Aminas bioativas, polifenóis e antocianinas em vinhos tintos de mesa nacionais. 2015. Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2015.

BRASIL, Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei Nº 10.970, de 12 de novembro de 2004, Brasil, 1988. Disponível em: <

BRITO, Natilene Mesquita et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 13, 2003.

CAMPOS, Camila DM et al. Sample preparation assisted by electric fields: fundamentals, advances, applications, and trends. Quim. Nova, v. 38, n. 8, p. 1093-1106, 2015.

CAO, Di et al. An in situ derivatization combined with magnetic ionic liquid-based fast dispersive liquid-liquid microextraction for determination of biogenic amines in food samples. Talanta, v. 199, p. 212-219, 2019.

CARDOSO, Rafael Melo et al. Desenvolvimento, fabricação e aplicação de dispositivos eletroquímicos usando impressão 3D. 2020. Tese de doutorado. Instituto de Química. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2020.

CARDOZO, Monique et al. Aminas biogênicas: um problema de saúde pública. Revista Virtual de Química, v. 5, n. 2, p. 149-168, 2013.

CIUBARĂ, A. et al. Design and production of plastic parts for read-write didactic equipment using 3D printer. In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. IOP Publishing, 2018. p. 032013.

COLIMO, Aline Garus Saint Clair. Avaliação do teor de metais e aminas biogênicas nos vinhos produzidos a partir de uvas cultivadas em solos condicionados com subprodutos de xisto. 2013. Dissertação de mestrado. Faculdade de Química. Universidade Federal Do Paraná. Curitiba. 2013.

COSTA, Marion P. et al. Determination of biogenic amines by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) in probiotic cow's and goat's fermented milks and acceptance. Food Science & Nutrition, v. 3, n. 3, p. 172-178, 2015.

DA SILVA, Tarliane Maria. Otimização e validação de método para determinação de histamina em pescado. 2008. Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2008.

DA SILVA, Emelle Kelly Nascimento. Detecção de fluorescência por imagens digitais em placas de spot tests fabricadas por tecnologia de impressão 3D. 2018. Monografia de graduação. Instituto de Química. Universidade Federal do Pará. Belém. 2018.

DABAGUE, Leonardo Augusto Moraes. O processo de inovação no segmento de impressoras 3D. 2014. Monografia de graduação. Instituto de Ciências Econômicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2014.

DANIEL, Daniela et al. Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1416, p. 121-128, 2015.

DE FATIMA SILVA, Fabiane. Qualidade do leite materno em banco de leite humano: aspectos bacteriológicos, físico-químicos e perfil de aminas bioativas. 2008. Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

DE SCHUTTER, Geert et al. Vision of 3D printing with concrete—Technical, economic and environmental potentials. *Cement and Concrete Research*, v. 112, p. 25-36, 2018.

DENG, Jiewei et al. Slug-flow microextraction coupled with paper spray mass spectrometry for rapid analysis of complex samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 940, p. 143-149, 2016.

DI DONNA, Leonardo et al. Rapid assay of resveratrol in red wine by paper spray tandem mass spectrometry and isotope dilution. *Food chemistry*, v. 229, p. 354-357, 2017.

DINIZ, Fabiana Barbosa. Elaboração de tabela de aminas bioativas em alimentos e estimativa da ingestão no Brasil. 2015. Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2015.

DONTHUAN, Jaruwat; YUNCHALARD, Sirinda; SRIJARANAI, Supalax. Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid–liquid microextraction of biogenic amines in fermented foods before their simultaneous analysis by high-performance liquid chromatography. *Journal of separation science*, v. 37, n. 21, p. 3164-3173, 2014.

DOEUN, Dara; DAVAATSEREN, Munkhtugs; CHUNG, Myung-Sub. Biogenic amines in foods. *Food science and biotechnology*, v. 26, n. 6, p. 1463-1474, 2017.

DUARTE, Lucas da Costa et al. Impressão 3D: uma alternativa para fabricação de dispositivos analíticos miniaturizados. 2016. Dissertação de mestrado. Instituto de Química. Universidade Federal de Goiás. Goiás. 2016.

EMBRAPA. Anuário do Leite. 2020. Brasil. p. 104.

GLÓRIA, M. Beatriz A.; IZQUIERDO-PULIDO, Maria. Levels and significance of biogenic amines in Brazilian beers. *Journal of food composition and analysis*, v. 12, n. 2, p. 129-136, 1999.

GROSS, Bethany; LOCKWOOD, Sarah Y.; SPENCE, Dana M. Recent advances in analytical chemistry by 3D printing. *Analytical chemistry*, v. 89, n. 1, p. 57-70, 2017.

GUO, Tianyang; YONG, Wei; DONG, Yiyang. Automatically high-throughput quantification by paper spray ionization mass spectrometry for multiple pesticides in wine. *Food Analytical Methods*, v. 12, n. 5, p. 1208-1217, 2019.

HU, Zhongqiu et al. Ultrasensitive and simultaneous determination of twenty-one amino acids and amines in culture media, red wine and beer. *Food chemistry*, v. 158, p. 56-65, 2014.

HUANG, Chih-Ying et al. Analysis of seven biogenic amines and two amino acids in wines using micellar electrokinetic chromatography. *Applied Sciences*, v. 9, n. 6, p. 1193, 2019.

IFCN. Dairy Report. 2019. v. 20. p. 24.

IZIDORO, B. F. et al. Modificação de suportes de poli (ácido láctico) obtidos por impressora 3d para imobilização de lipase de *rhizopus oryzae*. 2019.

JASTRZEBSKA, Aneta et al. A new derivatization reagent for determination of biogenic amines in wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 48, p. 111-119, 2016.

JOÃO, Afonso Filipe et al. Sensores eletroquímicos e dispositivo analítico combinado a smartphone fabricados por impressão 3D para o controle de qualidade de combustíveis. 2021.

KAMANESH, Marzieh et al. Application of a novel electromembrane extraction and microextraction method followed by gas chromatography-mass spectrometry to determine biogenic amines in canned fish. *Analytical Methods*, v. 11, n. 14, p. 1898-1907, 2019.

LDB, Laboratório Didático de Bioquímica. Universidade Federal da Paraíba. Precipitação das proteínas por solventes orgânicos, Paraíba, Brasil, 2017. Disponível em: <<http://plone.ufpb.br/ldb/contents/paginas/precipitacao-das-proteinas-por-solventes-organicos>>. Acesso em: 2 jun 2021.

LEIFELD, Vanessa et al. Tratamentos clássicos de precipitação de proteínas aplicados a soro de leite visando decréscimo do potencial contaminante do efluente. 2014. Dissertação de mestrado. Departamento de Química. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa. 2014.

LORET, Suzanne; DELOYER, P.; DANDRIFOSSE, G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. *Food Chemistry*, v. 89, n. 4, p. 519-525, 2005.

LUPTON, Deborah. Fabricated data bodies: Reflections on 3D printed digital body objects in medical and health domains. *Social Theory & Health*, v. 13, n. 2, p. 99-115, 2015.

MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. Instrução Normativa nº 14, de 8 de fevereiro de 2018, Brasil, 2018. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/materia/>>

/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/5809096/do1-2018-03-09-instrucao-normativa-n-14-de-8-de-fevereiro-de-2018-5809092>. Acesso em: 2 jun 2021.

MILHEIRO, Juliana et al. A simple dispersive solid phase extraction clean-up/concentration method for selective and sensitive quantification of biogenic amines in wines using benzoyl chloride derivatisation. *Food chemistry*, v. 274, p. 110-117, 2019.

MIRANDA, Marina Jurisch Purri. Espectrometria de massas com ionização paper spray: uma nova abordagem na solução de problemas forenses. 2019. Dissertação de mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2019.

MITOURAS, Dimitris et al. Medical 3D printing for the radiologist. *Radiographics*, v. 35, n. 7, p. 1965-1988, 2015.

MOREIRA, Juliane Soares. Determinação de cocaína e lidocaína em saliva empregando preparo de amostra assistido por campo elétrico associado à cromatografia líquida-espectrometria de massas sequencial. 2018. Dissertação de mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2018.

MURPHY, Sean V.; ATALA, Anthony. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology*, v. 32, n. 8, p. 773-785, 2014.

NADEEM, Muhammad et al. Determination of histamine in fish without derivatization by indirect reverse phase-HPLC method. *Microchemical Journal*, v. 144, p. 209-214, 2019.

NALAZEK-RUDNICKA, Katarzyna; WASIK, Andrzej. Development and validation of an LC-MS/MS method for the determination of biogenic amines in wines and beers. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, v. 148, n. 9, p. 1685-1696, 2017.

OEDIT, Amar et al. Integration of three-phase microelectroextraction sample preparation into capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 1610, p. 460570, 2020.

OCHI, Naoki. Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in salted mackerel fillet by ion-pair solid-phase extraction and volatile ion-pair reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1601, p. 115-120, 2019.

PALOMINO-VASCO, Mónica et al. Automated chromatographic method with fluorescent detection to determine biogenic amines and amino acids. Application to craft beer brewing process. *Journal of Chromatography A*, v. 1601, p. 155-163, 2019.

PEREIRA, Giovana Mayrink Alves et al. Ionização ambiente em espectrometria de massas: construção de uma fonte de ionização LTP e modificações na técnica PS-MS. 2020. Dissertação de mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2020.

PU, Fan et al. Fast quantitation of pyrazole fungicides in wine by ambient ionization mass spectrometry. *Analytical Methods*, v. 9, n. 34, p. 5058-5064, 2017.

PubChem, National Center for Biotechnology Information. Explore Chemistry. Bethesda, USA, 2022. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 2 jun 2021.

REZAZADEH, Maryam et al. One-way and two-way pulsed electromembrane extraction for trace analysis of amino acids in foods and biological samples. *Analytica chimica acta*, v. 773, p. 52-59, 2013.

RAMON-MARQUEZ, Teresa et al. Novel optical sensing film based on a functional nonwoven nanofibre mat for an easy, fast and highly selective and sensitive detection of tryptamine in beer. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 79, p. 600-607, 2016.

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

SAGRATINI, Gianni et al. Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 132, n. 1, p. 537-543, 2012.

SANTOS, Wandilma C. et al. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 C. *Food chemistry*, v. 81, n. 4, p. 595-606, 2003.

SANTOS, Simone Silveira Nery da Silva et al. Caracterização química de leite em pó para produção de material de referência certificado. Tese de Doutorado. Centro de Energia Nuclear Na Agricultura. Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2016.

SILVA, Ana Carla Pires. Exemplos de Aplicação de Impressão 3D na Construção. 2020. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia. Universidade do Porto. Porto. 2020

STAVROPOULOU, Despoina Angeliki et al. Amino acid conversions by coagulase-negative staphylococci in a rich medium: Assessment of inter-and intraspecies heterogeneity. *International Journal of Food Microbiology*, v. 212, p. 34-40, 2015.

SU, Yuan; MA, Xiaoxiao; OUYANG, Zheng. Rapid screening of multi-class antimicrobial residues in food of animal origin by paper spray mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 434, p. 233-239, 2018.

TAŠEV, Krste; IVANOVA-PETROPULOS, Violeta; STEFOVA, Marina. Ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-TQ/MS) for evaluation of biogenic amines in wine. *Food Analytical Methods*, v. 10, n. 12, p. 4038-4048, 2017.

TORRE, César Aquiles Lázaro. Utilização da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação de aminas biogênicas como ferramenta para a avaliação da qualidade carne de aves. 2013. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal Fluminense. Niterói.

TUBEROSO, Carlo Ignazio Giovanni et al. Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food chemistry*, v. 175, p. 29-35, 2015.

VALENTE, Inês M. et al. Application of gas-diffusion microextraction for high-performance liquid chromatographic analysis of aliphatic amines in fermented beverages. *Analytical Methods*, v. 4, n. 8, p. 2569-2573, 2012.

WANG, He et al. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. *Angewandte Chemie*, v. 122, n. 5, p. 889-892, 2010.

WANG, Qian et al. A silica coated paper substrate: development and its application in paper spray mass spectrometry for rapid analysis of pesticides in milk. *Analyst*, v. 140, n. 23, p. 8048-8056, 2015.

WAHEED, Sidra et al. 3D printed microfluidic devices: enablers and barriers. *Lab on a Chip*, v. 16, n. 11, p. 1993-2013, 2016.

ZARGHAMPOUR, Fereshteh et al. Electromembrane extraction of biogenic amines in food samples by a microfluidic-chip system followed by dansyl derivatization prior to high performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1556, p. 21-28, 2018.

ZHANG, Yu-jia et al. A review of pretreatment and analytical methods of biogenic amines in food and biological samples since 2010. *Journal of Chromatography A*, v. 1605, p. 360361, 2019.

ANEXO A

6.1 Planejamento Box-Behnken para otimização das condições de eletroextração

Tabela 23 - Parâmetros da ANOVA para a triptamina.

| FV | SQ | GL | MQ | F | p | |
|----------------------|-----------|----|----------|--------|--------|-------------------|
| Modelo | 1,860E+05 | 6 | 30999,18 | 7,76 | 0,0026 | significativo |
| A-Potencial elétrico | 87571,12 | 1 | 87571,12 | 21,91 | 0,0009 | |
| B-Tempo | 42195,12 | 1 | 42195,12 | 10,56 | 0,0087 | |
| C-Acetonitrila | 3836,88 | 1 | 3836,88 | 0,9600 | 0,3503 | |
| AB | 31293,61 | 1 | 31293,61 | 7,83 | 0,0189 | |
| AC | 2981,16 | 1 | 2981,16 | 0,7459 | 0,4080 | |
| BC | 18117,16 | 1 | 18117,16 | 4,53 | 0,0591 | |
| A ² | 39966,22 | 10 | 3996,62 | | | |
| B ² | 16463,85 | 6 | 2743,97 | 0,4670 | 0,8068 | |
| C ² | 23502,37 | 4 | 5875,59 | | | |
| Resíduo | 2,260E+05 | 16 | | | | |
| Falta de ajuste | 1,860E+05 | 6 | 30999,18 | 7,76 | 0,0026 | Não significativo |
| Erro puro | 87571,12 | 1 | 87571,12 | 21,91 | 0,0009 | |
| Total | 42195,12 | 1 | 42195,12 | 10,56 | 0,0087 | |

Tabela 24 - Parâmetros da ANOVA para a espermidina.

| FV | SQ | GL | MQ | F | p | |
|----------------------|-----------|----|----------|--------|--------|-------------------|
| Modelo | 1,253E+05 | 6 | 20890,63 | 9,91 | 0,0010 | significativo |
| A-Potencial elétrico | 45451,13 | 1 | 45451,13 | 21,56 | 0,0009 | |
| B-Tempo | 27051,38 | 1 | 27051,38 | 12,83 | 0,0050 | |
| C-Acetonitrila | 5070,24 | 1 | 5070,24 | 2,40 | 0,1520 | |
| AB | 18604,96 | 1 | 18604,96 | 8,82 | 0,0140 | |
| AC | 3757,69 | 1 | 3757,69 | 1,78 | 0,2115 | |
| BC | 25408,36 | 1 | 25408,36 | 12,05 | 0,0060 | |
| A ² | 21082,81 | 10 | 2108,28 | | | |
| B ² | 11296,92 | 6 | 1882,82 | 0,7696 | 0,6319 | |
| C ² | 9785,89 | 4 | 2446,47 | | | |
| Resíduo | 1,464E+05 | 16 | | | | |
| Falta de ajuste | 1,253E+05 | 6 | 20890,63 | 9,91 | 0,0010 | Não significativo |
| Erro puro | 45451,13 | 1 | 45451,13 | 21,56 | 0,0009 | |
| Total | 27051,38 | 1 | 27051,38 | 12,83 | 0,0050 | |

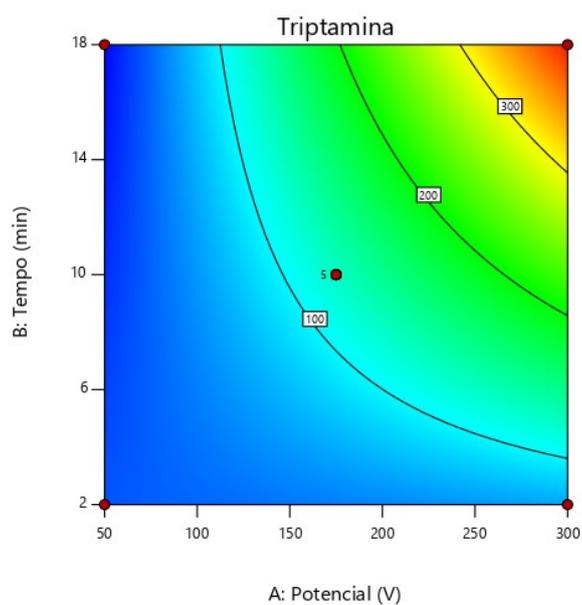
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Triptamina

● Design Points
1,6  400,4

X1 = A: Potencial
X2 = B: Tempo

Actual Factor
C: Acetonitrila = 25



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Triptamina

● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
1,6  400,4

X1 = A: Potencial
X2 = B: Tempo

Actual Factor
C: Acetonitrila = 25

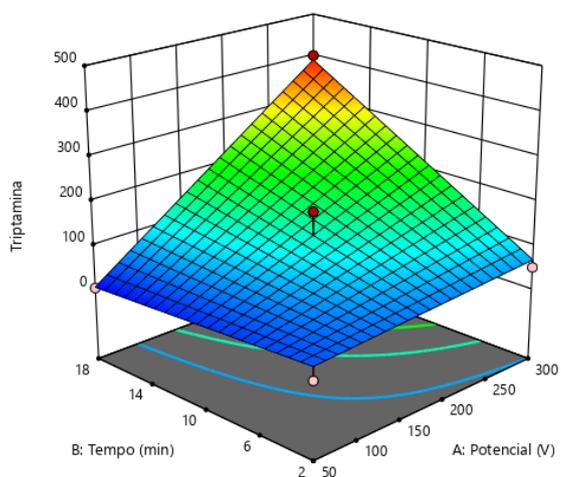


Figura 35 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para potencial e o tempo na otimização dos parâmetros da eletroextração para a triptamina.

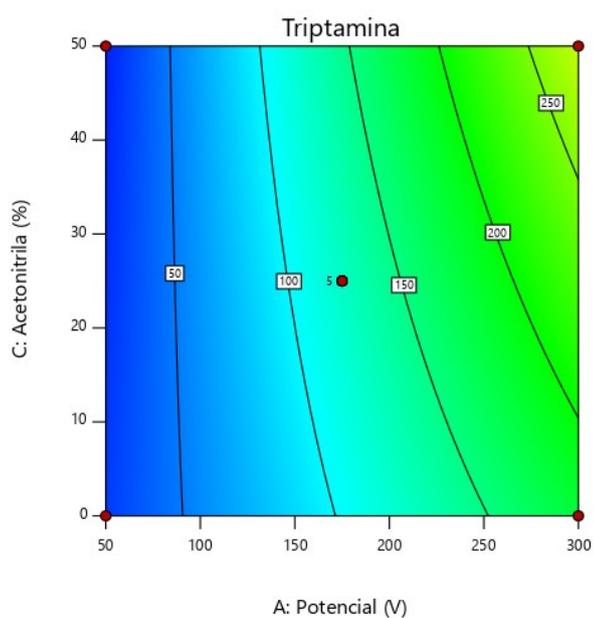
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Triptamina

● Design Points
1,6  400,4

X1 = A: Potencial
X2 = C: Acetonitrila

Actual Factor
B: Tempo = 10



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Triptamina

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

1,6  400,4

X1 = A: Potencial
X2 = C: Acetonitrila

Actual Factor
B: Tempo = 10

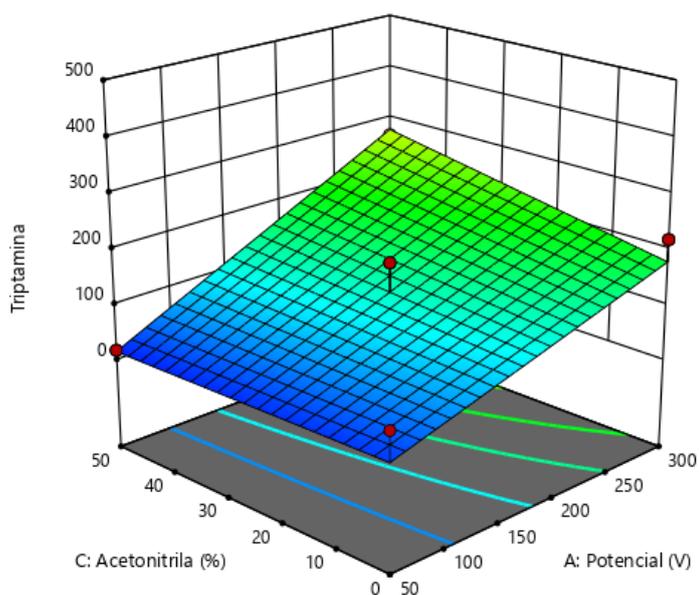


Figura 36 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para potencial e acetonitrila na otimização dos parâmetros da eletroextração para a triptamina.

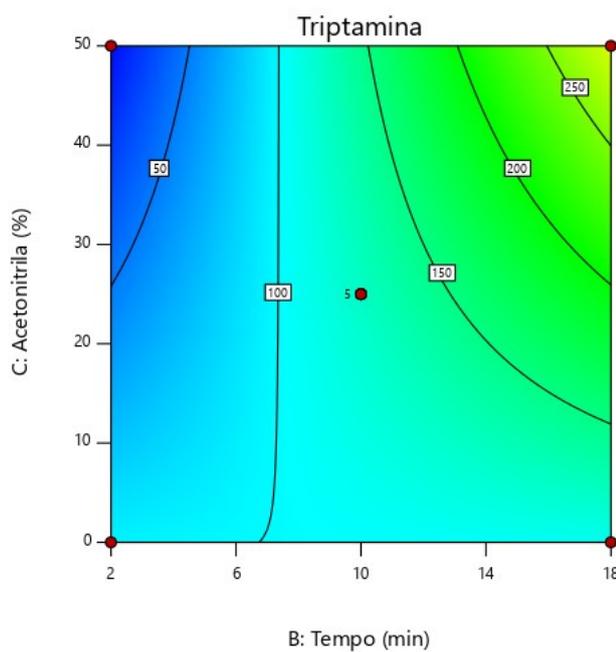
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Triptamina

● Design Points
1,6  400,4

X1 = B: Tempo
X2 = C: Acetonitrila

Actual Factor
A: Potencial = 175



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Triptamina

● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
1,6  400,4

X1 = B: Tempo
X2 = C: Acetonitrila

Actual Factor
A: Potencial = 175

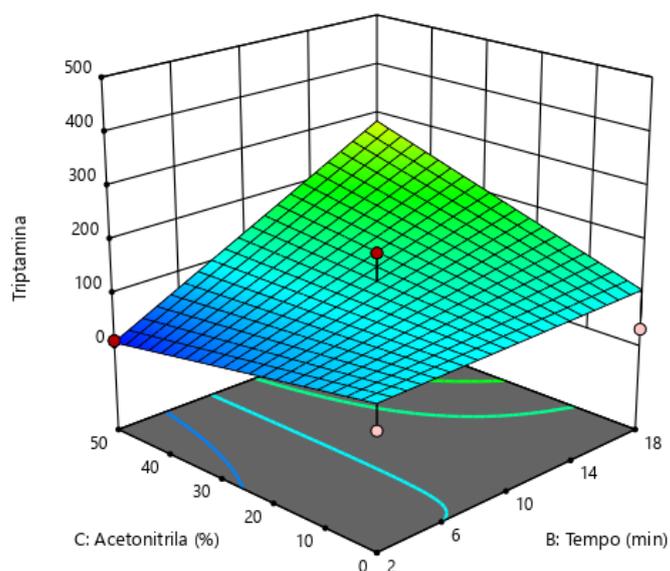


Figura 37 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para acetonitrila e o tempo na otimização dos parâmetros da eletroextração para a triptamina.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Espermidina

● Design Points

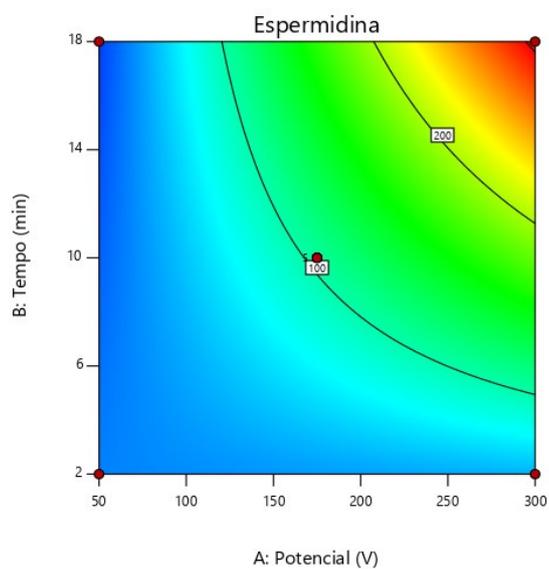
0,6  300,4

X1 = A: Potencial

X2 = B: Tempo

Actual Factor

C: Acetonitrila = 25



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Espermidina

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

0,6  300,4

X1 = A: Potencial

X2 = B: Tempo

Actual Factor

C: Acetonitrila = 25

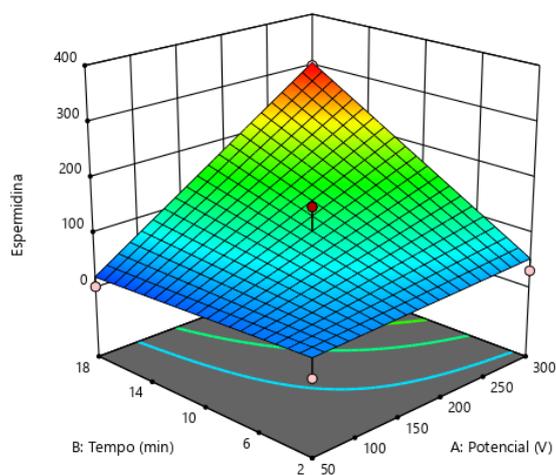


Figura 38 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para potencial e o tempo na otimização dos parâmetros da eletroextração para a espermidina.

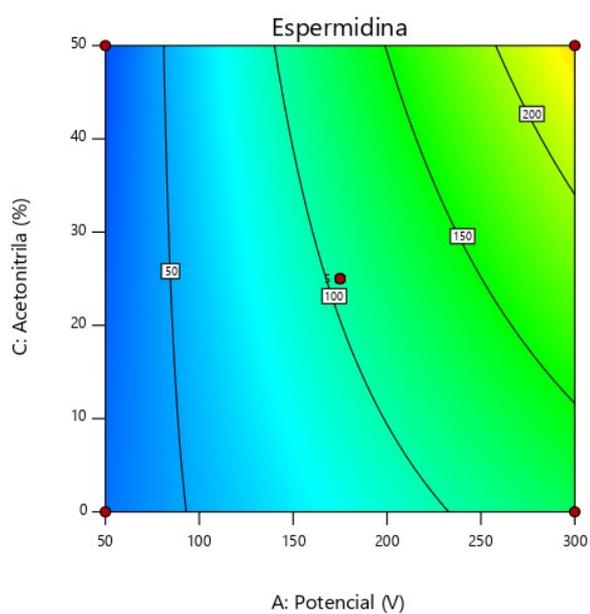
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Espermidina

● Design Points
0,6 300,4

X1 = A: Potencial
X2 = C: Acetonitrila

Actual Factor
B: Tempo = 10



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Espermidina

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

0,6 300,4

X1 = A: Potencial
X2 = C: Acetonitrila

Actual Factor
B: Tempo = 10

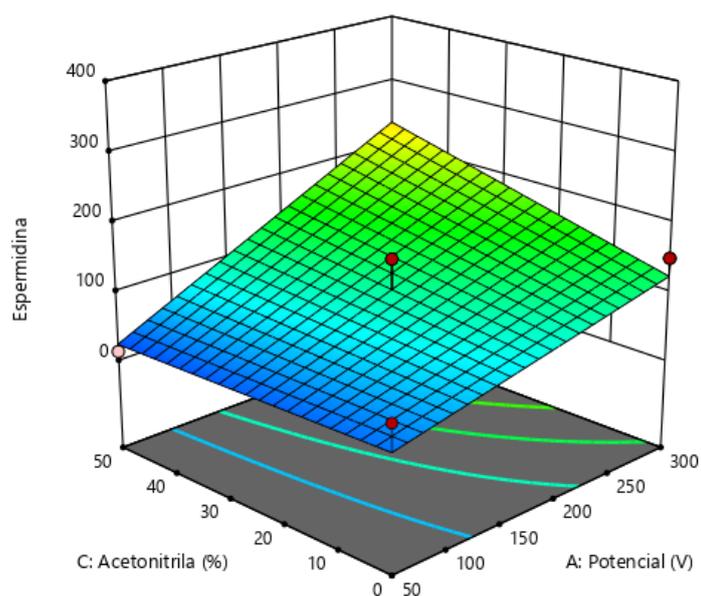


Figura 39 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para potencial e acetonitrila na otimização dos parâmetros da eletroextração para a espermidina.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Espermidina

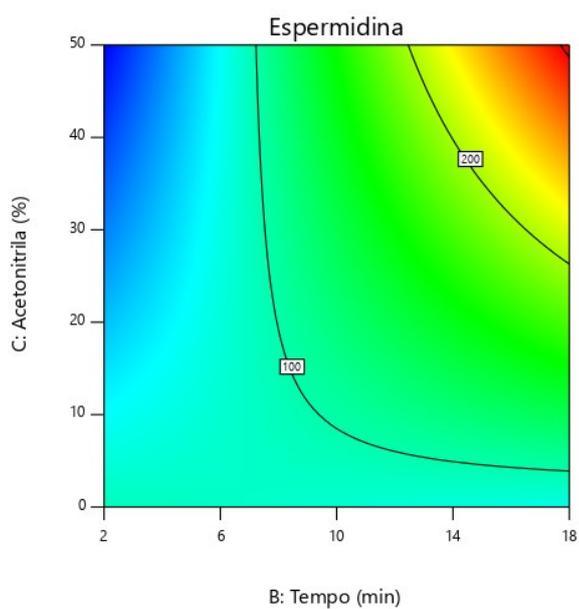
0,6  300,4

X1 = B: Tempo

X2 = C: Acetonitrila

Actual Factor

A: Potencial = 202,5



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Espermidina

0,6  300,4

X1 = B: Tempo

X2 = C: Acetonitrila

Actual Factor

A: Potencial = 202,5

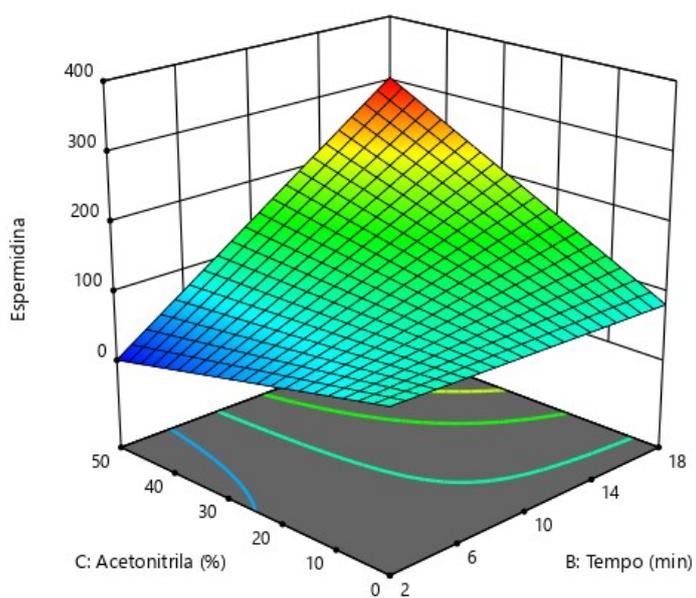


Figura 40 - Superfície de resposta e diagrama de contorno para acetonitrila e o tempo na otimização dos parâmetros da eletroextração para a espermidina.