

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA BASEADA NA
PARTIÇÃO/PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA A
QUANTIFICAÇÃO DOS TRÊS ISÔMEROS DE CRESOL EM BACON**

MARIA EDUARDA ANDRADE RUAS



Maria Eduarda Andrade Ruas

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA BASEADA NA
PARTIÇÃO/PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA A
QUANTIFICAÇÃO DOS TRÊS ISÔMEROS DE CRESOL EM BACON**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Ciências Agrárias da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial,
para a obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dra. Gevany Paulino de Pinho

Montes Claros

2024

Maria Eduarda Andrade Ruas. DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA BASEADA NA PARTIÇÃO/PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS TRÊS ISÔMEROS DE CRESOL EM BACON

Aprovada pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério – ICA/UFMG

Profa. Dra. Janaína Teles de Faria – ICA/UFMG

Profa. Dra. Gevany Paulino de Pinho – Orientadora - ICA/UFMG

Montes Claros, 20 de junho de 2024.

A **Deus** e sua infinita bondade em agradecer
o meu caminho com **familiares, amigos e professores** iluminados.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o autor de todos os projetos em minha vida.

Aos meus pais, Alex e Carla, por compartilharem e alimentarem meus ideais, incentivando-me a prosseguir na jornada. O carinho de suas palavras, a esperança em seus sorrisos e o brilho em seus olhares me fazem tão grande quanto o amor que têm por mim.

À minha irmã Natália, por sua constante paciência e cuidado, por me socorrer em minhas dificuldades acadêmicas. Você é a minha maior inspiração de vida!

À minha avó Neuza, que foi exemplo de amor, carinho e dedicação. Sua influência está gravada em meu coração por toda a vida.

Às minhas amadas madrinhas, Cláudia, Mércia e Thuanny, agradeço pelas orações e pelo amor constante que me oferecem.

Aos meus tios, tias, primos(as) e amigos, agradeço pelo apoio e compreensão que me concederam nos momentos em que estive ausente.

À Beatriz, Livia e Pedro, por serem fonte de amor inesgotável.

Ao meu amigo e irmão de coração, João Antônio, que tem sido presença constante em toda a minha vida.

À Anna Carolina, por sempre me socorrer em minhas dificuldades acadêmicas, além de todo o apoio e carinho que me concedeu.

À Josiane, por sua amizade, apoio e carinho em todos os momentos.

À Tatiane e Larissa, por dividirem comigo o fardo de todo o processo.

À professora Gevany, por todo apoio e oportunidades oferecidas ao longo da minha trajetória acadêmica. Seus ensinamentos estarão sempre presentes em minha vida.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial Ane, Brenda, Flávia, Karine, Lucélio, Luana, Luma, Gleison e Victor, por estarem sempre dispostos a me ajudar e por tornarem meus dias mais leves.

A todos os professores que se fizeram presentes em toda a minha jornada acadêmica.

A todas aquelas pessoas que desempenharam um papel fundamental em minha jornada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela infraestrutura disponibilizada e ao Laboratório de Química Instrumental (LQI).

A todos, o meu muito obrigada!

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime,
pois o senhor, o seu Deus, estará com você por onde andar”.

Josué 1:9

RESUMO

Os cresóis estão presentes principalmente em produtos defumados, onde através da queima da madeira ocorre a sua formação. Quando ingeridos, podem causar problemas cardiovasculares, respiratórios e inflamação no colón. A extração Sólido-Líquido com Purificação em Baixa Temperatura (ESL-PBT) viabiliza a extração eficiente dos analitos alvo em amostras de *bacon* defumado, enquanto a análise cromatográfica possibilita a quantificação de cresóis nessas amostras. O método desenvolvido, sob condições de repetitividade, apresentou resultados positivos, pois apresentou taxa de recuperação entre 90 a 105% e um desvio padrão relativo entre 3 e 9%. O limite de quantificação (LQ) foi correspondente a menor concentração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ no extrato final, sendo a menor concentração possível para a quantificação de cresóis em *bacon*. Curvas de calibração foram preparada nos níveis de 20, 100, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os padrões em solvente, e para os padrões na matriz, foram preparadas nas concentrações de 20, 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. O método foi linear para a curva em extrato da matriz, pois o coeficiente angular da curva foi superior a 0,99. As respostas cromatográficas diminuíram no decorrer das análises, o que caracteriza um efeito de matriz negativo. A ESL-PBT apresentou melhores resultados quando comparado ao método QuEChERS. As amostras reais de *bacon* defumado apresentaram altas concentrações de cresóis, variando de 62 a 1204 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Palavras-chave: Bacon; Isômeros do Cresol; ESL-PBT; Contaminante Químico.

LISTA DE FIGURA

| | |
|--|----|
| Figura 1- Valores de recuperação (%) obtidos no processo de otimização das ESL-PBT para quantidade de amostra de bacon | 30 |
| Figura 2 - Valores de recuperação para homogeneização da amostra com água em vórtex..... | 31 |
| Figura 3- Valores de recuperação para alteração da força iônica na água | 32 |
| Figura 4- Valores obtidos para os testes de homogeneização em três tipos de homogeneizadores para a otimização das variáveis da ESL-PBT..... | 33 |
| Figura 5- Avaliação da adsorção de cresóis a 50 µg L-1, em acetonitrila, em sete sorventes diferentes na proporção de 25 mg de sorvente/ mL de solução padrão. As análises de quantificação foram realizadas por CG-EM | 34 |
| Figura 6- Avaliação da limpeza dos extratos obtidos a partir da ESL-PBT seguida pela d-SPE em amostras de bacon com diferentes sorventes nas proporções de: (A) 25 mg de sorvente/ mL de extrato (B) 50 mg sorvente/ mL de extrato..... | 35 |
| Figura 7- Cromatograma dos extratos de bacon fortificados obtidos a partir da ESL-PBT com e sem a d-SPE usando o sorvente C18 | 36 |
| Figura 8- Avaliação do tempo de derivatização dos três isômeros dos cresóis presentes em extratos de bacon com BSTFA em função do tempo de reação | 37 |
| Figura 9- Cromatograma de extratos de bacon após a ESL-PBT, derivatização com BSTFA e análises por CG-EM | 38 |
| Figura 10- Gráficos dos resíduos da regressão das curvas analíticas para o-cresol, m-cresol e p-cresol (20 a 500 µg L-1) em extrato de bacon, com outliers diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife, sendo a linha tracejada = $\pm t_{crit} (0,95; -p-1) * S_{res}$ | 40 |
| Figura 11- Concentração em µg kg-1 dos três isômeros do cresol em diferentes amostras de bacon defumado. A extração foi realizada a partir da ESL-PBT e análise por CG-EM..... | 42 |

LISTA DE TABELA

| | |
|--|----|
| Tabela 1 -Valores nutricionais para porção de 100 g de <i>bacon</i> frito..... | 16 |
| Tabela 2 - Estrutura e propriedades físico-química dos cresóis | 17 |
| Tabela 3 - Parâmetros otimizados na extração de cresóis em <i>bacon</i> empregando a ESL-PBT..... | 24 |
| Tabela 4 - Dados da validação da ESL-PBT de cresóis em amostras de bacon seguida pela análises por CG-EM..... | 39 |

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros dos processos de validação para metodologias analíticas..... 21

LISTA DE ABREVIATURAS DE SIGLAS

| | |
|----------|--|
| ABIA | Associação Brasileira de Indústria de Alimentos |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| ATSDR | Agency for Toxic Substances and Disease Registry |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| LMR | Limite máximo de resíduos |
| BSTFA | <i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide |
| C18 | Octadecyl |
| CG-EM | Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| ESL | Extração sólido- líquido |
| ELL | Extração líquido-líquido |
| ESL-PBT | Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura |
| HLB | Hydrophilic-lipophilic balance |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia |
| K_{ow} | Coefficiente de partição octanol/água |
| LQ | Limite de quantificação |
| MAPA | Ministério da Agricultura e Pecuária |
| MELLD | Microextração líquido-líquido dispersiva |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PSA | Primary secondary amine |
| QuEChERS | Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe |
| SIM | Selected Ion Monitoring |
| SPME | Solid-phase microextraction |
| MEFS | Microextração em fase sólida |
| TCMS | Trimethylsilylimidazol |
| TMSI | <i>N</i> -metil-trimetilsililtrifluoroacetamida |
| MSTFA | <i>N,O</i> -bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamida |
| MTBSTFA | Metiltrifluoroacetamida |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 16 |
| 2.1 | Bacon | 16 |
| 2.2 | Cresóis | 17 |
| 2.2 | Extração Sólido Líquido com Purificação em Baixa Temperatura (ESL-PBT) | 18 |
| 2.4 | Derivatização | 20 |
| 2.5 | Validação do método analítico..... | 20 |
| 3. | MATERIAL E MÉTODOS..... | 22 |
| 3.1 | Reagentes | 22 |
| 3.2 | Amostra de <i>bacon</i> livre de cresol | 22 |
| 3.3 | Equipamentos laboratoriais..... | 23 |
| 3.4 | Análise instrumental | 23 |
| 3.5 | Fortificação | 23 |
| 3.6 | Método de extração..... | 24 |
| 3.6 | ESL-PBT..... | 25 |
| 3.7 | Derivatização | 26 |
| 3.8 | Calibração na matriz em um único nível | 26 |
| 3.9 | Validação do método | 26 |
| 3.10 | Comparação entre métodos QuEChERS | 27 |
| 3.11 | Amostras reais..... | 28 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 4.1 | ESL-PBT..... | 29 |
| 4.2 | Massa de amostra..... | 29 |
| 4.3 | Homogeneização da amostra com água..... | 30 |
| 4.4 | Força iônica..... | 31 |
| 4.5 | Homogeneização da amostra, água e acetonitrila..... | 32 |
| 4.6 | Sorventes..... | 33 |
| 4.7 | Derivatização dos cresóis..... | 36 |
| 4.8 | Validação | 38 |
| 4.8.1 | Seletividade..... | 38 |
| 4.8.2 | Limite de quantificação..... | 38 |
| 4.8.3 | Linearidade | 39 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 4.9 Efeito de matriz | 41 |
| 4.10 Comparação entre métodos | 41 |
| 4.11 Amostras Reais | 41 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 43 |
| REFERÊNCIAS | 44 |

1 INTRODUÇÃO

A defumação de alimentos é uma tecnologia usada para preservar e conferir sabor, cor e textura desejáveis aos alimentos. O processo de defumação, tradicional ou industrial, pode ser realizado pela exposição dos alimentos à fumaça obtida da queima de madeira (Yin *et al.*, 2021). A lignina é um constituinte da madeira e, quando aquecida a uma temperatura de 350 °C, produz subprodutos como *o*-cresol, *m*-cresol e *p*-cresol (Guillen e Ibargoitia 1999, Pereira *et al.*, 2022, Rigling *et al.*, 2023). Até agora, a presença desses isômeros de cresol em alimentos defumados tem sido de considerável importância para as propriedades organolépticas dos produtos defumados (Ojeda *et al.*, 2002, Kostyra e Barytko-Pikielna, 2006), contudo, eles causam potenciais efeitos tóxicos nos humanos, diminuindo a qualidade de vida.

Os cresóis são compostos fenólicos metilados, conhecidos como poluentes orgânicos ambientais devido ao seu caráter refratário e alta toxicidade para plantas, animais e humanos (Duan *et al.*, 2018, Yang *et al.*, 2022, Kadia e Chhaya, 2023). A Agency for Toxic Substances and Disease Registry dos Estados Unidos (ATSDR) inseriu os cresóis na lista de substâncias prioritárias devido à sua frequência, toxicidade e potencial de exposição humana (ATSDR, 2022). No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2006), através da Resolução nº 375/2006, estabeleceu um limite máximo de resíduos (LMR) para cresóis totais (Σ cresol = 160 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em solos tratados com lodo de esgoto.

Quanto aos impactos na saúde humana, o *p*-cresol tem sido o isômero mais investigado, pois pode ser produzido no cólon a partir do metabolismo da tirosina por bactérias endógenas (Saito *et al.*, 2018, Harisson *et al.*, 2022). Níveis elevados de *p*-cresol no sangue têm sido associados a doença renal crônica (Levey *et al.*, 2007, Rong e Kiang 2020), problemas cardiovasculares (Liu e Tomino, 2018), inflamação do cólon (O'Keefe 2016) e síndrome do espectro autista (Persico e Napolioni, 2013). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que o *p*-cresol em altas concentrações é genotóxico para colonócitos (Andriamihaja *et al.*, 2015).

Assim, os níveis de cresol em alimentos defumados são preocupantes e precisam ser investigados. Entre os alimentos defumados, o *bacon* se destaca devido ao seu alto consumo em todo o mundo (Muneka *et al.*, 2021). O consumo global de bacon é de cerca de 6 kg/pessoa/ano e, em 2022, o mercado global de bacon alcançou US\$ 68,5 bilhões, com uma taxa de crescimento anual média de 3,6% (Index Box Market Intelligence,

2024). No Brasil, de acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos (ABIA, 2024), o consumo de bacon atingiu 90.000 toneladas/ ano.

A investigação de compostos fenólicos em alimentos requer um procedimento de extração e subsequente análise instrumental. Shishov *et al.* (2020) propuseram uma mistura eutética profunda baseada em microextração com membrana para a determinação de compostos fenólicos em salsichas e peixes defumados. Vakh *et al.* (2017) desenvolveram um método de quimioluminescência com injeção em fluxo para a determinação de fenóis em amostras de salsichas defumadas, baseado no acoplamento da extração sólido-líquido assistida por ultrassom com separação por difusão gasosa. Já, Du *et al.* (2021) utilizaram a microextração em fase sólida (SPME) para determinar fenóis em amostras de bacon defumado.

A extração sólido-líquido com purificação a baixa temperatura (ESL-PBT) é uma alternativa viável para extrair contaminantes orgânicos em matrizes lipofílicas (Magalhães *et al.*, 2013, Rubensan *et al.*, 2013, Sousa *et al.*, 2014, França *et al.*, 2015, Cheibub *et al.*, 2019), pois é acessível, fácil de realizar, permite a extração de analitos e limpeza de extratos (partição e purificação) simultaneamente e é compatível com qualquer análise cromatográfica. Esta técnica consiste em adicionar água à amostra com baixo teor de umidade, seguida de acetonitrila, e a mistura é devidamente homogeneizada. O equilíbrio água-acetonitrila é quebrado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e os componentes da matriz são retidos na água congelada enquanto a acetonitrila líquida extrai os analitos alvo.

A Cromatografia Gasosa (CG) tem sido a melhor opção para identificar e quantificar os três cresóis individualmente, embora exija uma etapa de derivatização prévia para separar os isômeros *m*-cresol e *p*-cresol em uma coluna capilar comercial (Kovács *et al.*, 2008 e Xu *et al.*, 2020). A quantificação de cresol em níveis de traço pode ser realizada por espectrômetro de massa (EM) (Kovács *et al.*, 2008 e Xu *et al.*, 2020).

O objetivo do trabalho foi otimizar e validar a ESL-PBT e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas para quantificar cresóis em amostras de *bacon* defumado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bacon

Bacon é o produto cárneo obtido da parede torácico-abdominal de suínos, que vai do esterno ao púbis, com ou sem costela, com ou sem pele, com adição de ingredientes, curado, defumado, cozido ou não (MAPA, 2023). No Brasil, a produção de *bacon* ocupa 400 mil trabalhadores de toda cadeia produtiva segundo a Associação Brasileira de Indústria de Alimentos (ABIA, 2023), sendo a região sul do país a responsável por cerca de 50% da produção nacional. O *bacon* possui uma quantidade significativa de lipídeos. Os valores nutricionais para o produto frito são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 -Valores nutricionais para porção de 100 g de *bacon* frito

| Componentes | Valor por 100 g |
|-----------------------|-----------------|
| Umidade (g) | 7,50 |
| Carboidrato total (g) | 0,44 |
| Proteína (g) | 27,3 |
| Lipídios (g) | 64,3 |
| Cinzas (g) | 0,47 |

Fonte: TBCA – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2024

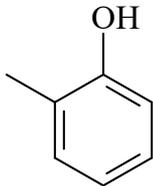
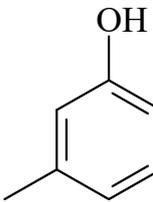
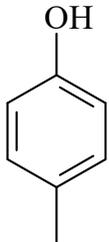
A técnica de defumação é uma das mais antigas formas de conservar alimentos (Stumpe- Viksna *et al.*, 2008; Sokamte *et al.*, 2020). O processo consiste na exposição do alimento à fumaça produzida pela combustão incompleta de determinadas madeiras (EMBRAPA, 2021). A defumação de alimentos pode ser realizada por duas vias: a defumação convencional e a defumação pela aspersão de fumaça líquida (Gonçalves *et al.*, 1998). No processo mais simples de defumação, o *bacon* é acondicionado em câmeras aquecidas pela combustão de madeiras, quando acontece a deposição da fumaça no produto (Torezan *et al.*, 2021).

As características sensoriais do produto dependem de diversos fatores, dentre eles o tipo e a umidade da madeira, além da temperatura de pirólise, uma vez que todos esses fatores influenciam na composição química da fumaça que permeia os produtos (Sokamte *et al.*, 2020). O tipo de madeira pode ser combinado durante o processo de defumação para realçar o sabor da carne. Uma variedade de madeira usada na defumação é o zimbro, comumente empregado para aprimorar o sabor dos alimentos defumados. O carvão vegetal tem sido amplamente utilizado como fonte de energia no preparo de alimentos, como na defumação de carnes, sendo visto como uma opção de lenha menos perigosa (Stumpe-Viksna *et al.*, 2008)

2.2 Cresóis

Os cresóis são compostos orgânicos aromáticos classificados como fenóis. Atualmente, não há limite de resíduos em alimentos, apenas em amostras de lodo de esgoto. Na Tabela 2 são apresentados as características físico-química dos três isômeros de cresóis.

Tabela 2 - Estrutura e propriedades físico-química dos três isômeros de cresóis

| Propriedades | <i>o</i> -cresol | <i>m</i> -cresol | <i>p</i> -cresol |
|-------------------|---|---|---|
| Estrutura química |  |  |  |
| Fórmula Molecular | C ₇ H ₈ O | C ₇ H ₈ O | C ₇ H ₈ O |
| Número CAS | 95-48-7 | 108-39-4 | 106-44-5 |
| Massa molar | 108,14 g/mol | 108,14 g/mol | 108,14 g/mol |
| Ponto de ebulição | 197,0 °C | 203, 0 °C | 202,5 °C |
| Ponto de fusão | 31 °C | 8 – 10 °C | 35 °C |

| | | | |
|------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Pressão de vapor | 3.1 hPa (60°C) | < 1 hPa (20 °C) | 0.147 hPa (25°) |
| Solubilidade em água (25° C) (g/L) | 25,95 | 22,70 | 21,52 |
| K_{ow} | 1,95 | 1,96 | 1,94 |

Fonte: PubChem Compound Summary

Estrutura feita no *software* chemwindow, 2024.

Os cresóis migram preferencialmente para acetonitrila, devido a sua baixa solubilidade em água e coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), como demonstrados na Tabela 2. Os isômeros de cresóis são empregados individualmente ou combinados na fabricação de desinfetantes, conservantes, corantes, fragrâncias, herbicidas, inseticidas, explosivos, e também como antioxidantes para estabilizar óleos lubrificantes, combustíveis, borracha, polímeros, elastômeros e alimentos. Alguns cresóis são utilizados como conservantes de madeira, solventes para revestimentos de resina sintética, desengordurantes, flotação de minérios, tintas e produtos têxteis (Sanders *et al.*, 2009).

A pirólise da lignina é responsável pela maioria dos aromas dos defumados. Os componentes derivados da lignina incluem fenóis, ésteres fenólicos, seus homólogos e derivados com grupos substituintes como metila, etila, propila, vinila, alila e propileno (Brustolin, 2013). A formação da lignina ocorre sempre na posição para do hidroxilo fenólico e geralmente não ultrapassa três átomos de carbono (Brustolin, 2013). O ácido ferúlico é um composto intermediário na degradação térmica da lignina, sendo a pirólise responsável pela produção posterior de produtos fenólicos após a descarboxilação (Brustolin, 2013).

2.2 Extração Sólido Líquido com Purificação em Baixa Temperatura (ESL-PBT)

As técnicas de preparo de amostras mais usualmente utilizadas para extração de contaminantes atualmente são: extração em fase sólida (EFS), extração líquido-líquido (ELL), método QuEChERS, Microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD),

microextração em fase sólida (MEFS), e extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT).

A extração em fase sólida (EFS) é um processo que utiliza sorventes acondicionados em cartuchos, normalmente na forma de seringa. Esse processo consiste em cinco etapas, sendo elas: (I) a ativação do sorvente, (II) o condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças de eluição do sorvente com o solvente das amostras, (III) a introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e, algumas vezes, de alguns interferentes, (IV) a limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito e (V) a eluição e coeluição do analito (Lingeman; Hoekstra-Oussoren, 1997).

Na extração líquido-líquido (ELL) ocorre a partição da analito entre duas fases, sendo elas a orgânica e a aquosa. Na ELL, é normalmente, utilizada um funil de separação e pode ser empregado um grande número de solventes puros e disponível comercialmente. Porém, as amostras com alta afinidade pela água são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, o que resulta na perda do analito (Queiroz; Collins; Jardim; 2001).

O método QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged, **S**afe) (Anastassiades *et al.*, 2003) é um procedimento de preparação de amostras que envolve uma extração líquido-líquido com base no fenômeno de *salting-out* (Donzelli Neto, 2019).

A técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD) se baseia na partição dos analitos entre duas fases que não se misturam, uma aquosa e outra orgânica. O processo envolve duas etapas: a primeira inclui a adição de uma mistura apropriada de solventes extrator e dispersante à amostra aquosa com os analitos, e a segunda etapa consiste na centrifugação da solução turva e na transferência da fase sedimentada para um recipiente para a análise dos analitos (Martins *et al.* 2012)

A microextração em fase sólida (MEFS) é geralmente realizada utilizando fibras, as quais são utilizadas como dispositivo de extração, absorção ou adsorção dos analitos (Kataoka e Saito, 2011).

A extração sólido-líquido com purificação e baixa temperatura (ESL-PBT) envolve a interação da amostra sólida com um solvente menos denso que a água, com um ponto de fusão menor que - 20 °C. Posteriormente, o sistema é agitado e mantido a baixas temperaturas. A fase aquosa congela e o solvente orgânico permanece líquido e nela contém o analito que serão analisadas por cromatográfica (Rosa, 2014). A ESL-PBT mostrou-se uma técnica favorável para alimentos, sendo aplicado em variadas matrizes

como manteiga (Marthe *et al.*, 2010), alface (Costa, 2011), abacaxi (Moraes *et al.* 2014), cenoura (Araújo *et al.*, 2016), abobrinha (Rodrigues *et al.*, 2018) e morango (Heleno *et al.*, 2019). Além disso, tem sido eficaz na detecção de agrotóxicos em alimentos e outras amostras por cromatografia (Rodrigues *et al.*, 2018).

2.4 Derivatização

A derivatização é um processo químico de modificação de compostos com finalidade de gerar novos compostos com melhores propriedades (Schummer *et al.*, 2009). O processo de derivatização pode ocorrer por esterificação, acilação e sililação (Lorres *et al.*, 1999). A sililação é o procedimento de derivatização utilizado para análises de cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas CG-EM (Knapp, 1979, apud Segura *et al.*, 1998). Alguns dos agentes de sililação frequentemente utilizados são o trimetilclorossilano (TMCS), trimetilsililimidazol (TMSI), N-metil-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e N-(t-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA). Sua capacidade de sililação, alta volatilidade e os subprodutos resultantes são os principais fatores por trás de sua ampla aplicação (Segura *et al.*, 1998).

A separação eficiente de misturas de isômeros de xilenos, cresóis, xilenóis, toluidinas e xilidinas é um desafio significativo (Peng *et al.*, 2016). Portanto, a distinção entre o *orto*-cresol e o *para*-cresol não é fácil, sendo a silanização uma técnica eficaz para a derivatização de álcoois e fenóis (Xu *et al.*, 2020).

2.5 Validação do método analítico

A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade da qual se destina (ANVISA, 2017), sendo um processo essencial para garantir a precisão e confiabilidade dos resultados obtidos. No Brasil, há três agências que são responsáveis em regular os procedimentos a serem utilizados durante a validação do método analítico, das quais: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO).

Alguns parâmetros a serem validados são: seletividade, exatidão, precisão, limite de quantificação e linearidade. No quadro 1 é possível encontrar as definições para cada parâmetro mencionado anteriormente.

Quadro 1 - Parâmetros dos processos de validação para metodologias analíticas

| Parâmetro | Conceito | Referência |
|-------------------------|--|-------------------|
| Seletividade | É o grau que permite quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou outros interferentes. | (AOAC, 2002) |
| Exatidão | Grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. | (ANVISA, 2017) |
| Precisão | Avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. | (ANVISA, 2017) |
| Limite de Quantificação | Representa a menor concentração a ser analisada da substância de interesse | (IMETRO, 2003) |
| Linearidade | Propriedade utilizada para fazer medições numa faixa de concentrações | (EURACHEM, 2002) |

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os padrões analíticos individuais de *o*-cresol, *m*-cresol e *p*-cresol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), com pureza superior a 99,9% (m/m). Soluções padrão individuais dos cresóis foram preparadas em acetonitrila grau HPLC (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil) na concentração de 500 mg L⁻¹. A partir destas soluções estoque foi preparada uma solução padrão intermediária com os cresóis (*o*, *m*, *p*-cresol) a 40 mg L⁻¹. Essa solução foi diluída para 4 mg L⁻¹ a fim de preparar uma solução de trabalho.

Durante a extração foi utilizada acetonitrila grau analítico da Êxodo Científica (Sumaré, Brasil). A derivatização foi realizada com anidrido acético, piridina (99,8% m/m) e BSTFA [*N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide], todos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Sete sorventes foram avaliados no estudo de limpeza dos extratos: carvão ativado da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), sílica gel da Carvalhaes (Rio Grande do Sul, Brasil), florisil da Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, NJ), HLB (Hidrophilic-lipophilic balance) da Waters Corporation (Milford, USA), alumina da Micro Abrasives (Westfield, USA), PSA (Primary Secondary Amine) e C18 ambos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Todos os sorventes foram condicionados três vezes com acetonitrila e secos em estufa a 40 °C antes do uso.

Bicarbonato de sódio da Cromato Produtos Químicos (São Paulo, Brasil) e sulfato de sódio anidro (99,8% m/m) da Sigma Aldrich (St. Louis, USA) foram submetidos ao aquecimento na mufla a 300 °C por 2 h para a remoção de possíveis interferentes.

3.2 Amostra de *bacon* livre de cresol

Uma amostra de *bacon* fresco (± 220 g) foi colocada em fritadeira elétrica (Mondial, AF- 30) pelo tempo de 45 min a uma temperatura de 90 °C. Posteriormente, ela foi triturada em um processador elétrico (Britânia, 2P) e armazenada no freezer (Consul, CRD36) a -18 °C. Essa amostra foi utilizada na etapa de otimização e validação do método proposto.

3.3 Equipamentos laboratoriais

Para o preparo de amostras foi utilizado uma balança analítica (Shimadzu, São Paulo, Brasil), um vórtex (Scilogex, Rocky Hill, USA), um banho ultrassônico (UNIQUE/ USC-1400, São Paulo, Brasil), uma centrífuga (Kindly/KC5, São Paulo, Brasil) e uma mesa agitadora a 160 rpm (Nova Ética/304- TP AE, São Paulo, Brasil).

3.4 Análise instrumental

Os extratos foram analisados utilizando um cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (CG 7890A) acoplado a um espectrômetro de massas (EM 5975C). Uma coluna capilar de sílica fundida SLB[®]-5ms da Merck (Darmstadt, Germany) com 30 m de comprimento x 0,32 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme interno foi usada para separação dos compostos. Hélio (pureza de 99,999%) foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 1 mL min⁻¹. O injetor *split/splitless* foi mantido a 280 °C e 1 µL de amostra foi injetado com razão de *split* 1:5, utilizando o autoinjeter CombiPAL. A programação de temperatura do forno iniciou em 75 °C (1 min) e, em seguida, foi aquecido até 115 °C, até 220 °C a uma taxa de 30 °C min⁻¹, totalizando um tempo de 12,5 min de análise cromatográfica. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV em um analisador de massas tipo quadrupolo. A interface foi mantida a 280 °C e a fonte de íons a 230 °C. O controle e obtenção de dados foram feitos com o *software* ChemStation (E.02.02.1431 *copyright*© 1989-2011) da Agilent Technology. As análises foram realizadas no modo de monitoramento de íons seletivo (MIS), sendo selecionados os íons $m/z = 107, 108$ e 150 para os cresóis acetilados e $m/z = 91, 165$ e 180 para os cresóis silanizados.

Um espectrofotômetro UV/Visível da Agilent Technologies (Cary 60) foi utilizado para a análise de extratos na região de 200 a 720 nm.

3.5 Fortificação

Para a otimização do método, as amostras de *bacon* livre de cresóis foram fortificadas com 100 µL de solução padrão de cresóis em acetonitrila a 4 mg L⁻¹,

correspondendo a $0,133 \text{ mg kg}^{-1}$. As amostras foram mantidas em repouso, à temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), durante 15 min, para incorporação dos cresóis na matriz.

3.6 Método de extração

Para determinar as condições ótimas do método de extração proposto, alguns parâmetros que podem afetar a extração dos cresóis, em bacon, bem como a limpeza dos extratos, foram avaliados univariadamente de acordo com os parâmetros descritos sucintamente na Tabela 3. O teste de médias foi realizado utilizando a análise de variância pelo método de Tukey.

Tabela 3 - Parâmetros otimizados na extração de cresóis em bacon empregando a ESL-PBT

| Parâmetros | Níveis |
|---|---|
| Massa de amostra | 3,00 e 4,00 g |
| Força iônica | 0, 300 e 500 mg de NaHCO_3 |
| Homogeneização: amostra + água | Vórtex 0 e 30 s |
| Homogeneização: amostra + água + solvente | Vórtex (30 s), ultrassom (10 min) e mesa agitadora (15 min) |
| Sorventes | C18, PSA, HLB, carvão ativado, sílica, florisil e alumina |

Durante a otimização da ESL-PBT, amostras de *bacon* (Tabela 3) foram transferidas para *vial* de vidro transparente de 22 mL e fortificadas. Posteriormente, foi avaliado o efeito da mistura de pequenas quantidades de NaHCO_3 à amostra (Tabela 3). Em seguida, 4 mL de água foi adicionada ao *vial* e nesta etapa foi avaliada a necessidade de homogeneização do sistema amostra + água em vórtex por 30 s (Tabela 3). Ao mesmo *vial* foi adicionado 8 mL de acetonitrila e em seguida, foi submetido a um dos modos de homogeneização, conforme apresentado na Tabela 3. Posteriormente, o *vial* foi mantido no freezer a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ por 40 min. Cerca de 2 mL de fase orgânica líquida foram transferidas para um tubo *falcon* contendo 340 mg de sulfato de sódio anidro. Essa massa de sal foi

otimizada para que toda a água remanescente na fase orgânica fosse removida. O frasco foi homogeneizado em vórtex por 30 s e centrifugado a 4000 rpm por 5 min. O extrato foi separado para a derivatização.

Uma etapa de *clean up* adicional foi avaliada empregando a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). Para isso, a adsorção dos cresóis nos sorventes (Tabela 3) foi estudada transferindo 2 mL de solução padrão de cresóis a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila para tubo *falcon* de 15 mL contendo 50 mg de sorvente. O tubo foi homogeneizado em vórtex por 30 s e centrifugado a 4000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi derivatizado e analisado por CG-EM. Uma solução padrão dos cresóis na mesma concentração ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) foi derivatizada e submetida à análise cromatográfica. A recuperação dos cresóis foi calculada a partir da equação: $\% = [(A_p - A_s) \times 100] / A_p$, sendo que A_p corresponde à razão de área cromatográfica da solução padrão e A_s corresponde a área dos cresóis no sobrenadante.

A limpeza dos extratos de *bacon* pelos sorventes foi avaliada a partir da análise espectrofotométrica nos comprimentos de onda (λ) entre 200 e 720 nm (UV/Visível). Para isso, 50 mg de sorventes (Tabela 3) foram misturados em tubo *falcon* (15 mL) com 2 mL de extratos de *bacon* livres de cresóis (branco) obtidos a partir da ESL-PBT. O frasco foi homogeneizado em vórtex por 10 s, centrifugado a 4000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi analisado no espectrofotômetro. O mesmo experimento foi realizado utilizando 100 mg de sorventes.

Em uma última avaliação do *clean up*, amostras de *bacon* fortificadas foram submetidas à ESL-PBT seguida pela d-SPE com C18 (25 mg/mL de extrato). O sobrenadante foi derivatizado e analisado no CG-EM para avaliação da recuperação dos cresóis e limpeza dos extratos.

3.6 ESL-PBT

Nas condições ótimas de extração, 3,00 g de *bacon* foram transferidos para um *vial* transparente de 22 mL, seguida pela adição de 4 mL de água à amostra e homogeneização em vórtex por 30 s. Posteriormente, 8 mL de acetonitrila foram adicionados ao frasco, homogeneizado em banho ultrassônico por 10 min e, refrigerado a uma temperatura de $-25 \text{ }^\circ\text{C}$, por 40 min. Após o congelamento, 2 mL de fase orgânica líquida foram transferidas para um tubo *falcon* de 15 mL contendo 340 mg de sulfato de sódio anidro. O tubo foi homogeneizado em vórtex, por 30 s, centrifugado por 5 min a

4000 rpm e 1,5 mL de sobrenadante foi separado para a derivatização e armazenado a -25 °C até o momento da análise por CG-EM.

3.7 Derivatização

A acetilação dos cresóis foi obtida transferindo 1 mL de extrato orgânico de *bacon* para um *vial* de injeção de 2 mL. Ao mesmo *vial* foi acrescentado 20 µL piridina e 100 µL de anidrido acético. As análises foram realizadas no período de 10 min a 4 h após a derivatização.

A silanização dos mesmos compostos foi realizada transferindo 50 µL de extrato orgânico de *bacon* para um *insert* de 250 µL e posteriormente 130 µL BSTFA. As análises por CG-EM foram realizadas com 90 min de derivatização.

3.8 Calibração na matriz em um único nível

Soluções padrão foram preparadas em extrato da matriz durante a otimização do método devido à complexidade da amostra. Para isso, amostras de *bacon* isentas de cresóis (branco) foram submetidas à ESL-PBT e o extrato obtido foi usado para preparar a solução padrão dos cresóis a 50 µg L⁻¹ em balão volumétrico de 2 mL. A solução padrão foi derivatizada e analisada por CG-EM. A recuperação (R) dos cresóis nos extratos foi calculada a partir da equação: %R = (área cromatográfica do cresol no extrato/área cromatográfica do cresol no padrão na matriz) x100.

3.9 Validação do método

O método proposto foi validado de acordo com os principais parâmetros apresentados no Documento N° SANTE/12682/2021 (Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed) da União Europeia.

A seletividade do método foi avaliada comparando o cromatograma do extrato de amostra de *bacon* fortificada com os cresóis a 53,3 µg kg⁻¹ e o cromatograma do extrato de amostra de *bacon* não fortificada (branco).

O limite de quantificação (LQ) do método foi determinado fortificando amostras de *bacon* (branco) em baixas concentrações. As amostras foram submetidas à ESL-PBT,

derivatizadas, analisadas por CG-EM e a quantificação foi realizada comparando a área cromatográfica dos cresóis no extrato da amostra com o padrão de calibração na mesma concentração, preparado em extrato da matriz. O LQ foi definido como a menor concentração dos cresóis que apresentou exatidão, precisão e a relação sinal ruído superior a 10. O ruído foi avaliado a partir de análises de extratos da matriz livres de cresóis (branco).

Inicialmente, a faixa linear de resposta do detector para os cresóis foi avaliada a partir das análises de padrões de calibração em solvente puro nas concentrações de 20, 100, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. A linearidade do método proposto também foi avaliada a partir das análises de padrões de calibração em extrato da matriz nas concentrações de 20, 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. As soluções padrão foram preparadas em três replicatas independentes. Os parâmetros da regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) aplicado ao modelo linear. Em seguida, gráficos dos resíduos da regressão foram construídos e examinados para identificação de *outliers* (valores extremos) pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife para a curva de calibração em extrato da matriz. O número máximo de *outliers* excluídos foram de 22,2% do número original de resultados.

O efeito de matriz (EM) foi avaliado comparando a inclinação das curvas analíticas com os padrões de calibração preparados em solvente puro e em extrato da matriz. A variação da resposta cromatográfica foi calculada a partir da equação: $\% \text{EM} = (1 - a_m/a_s) \times 100$, sendo a coeficiente angular, m matriz e s solvente.

3.10 Comparação entre métodos QuEChERS

O método proposto baseado na ESL-PBT foi comparado ao método QuEChERS (Oshiro *et al.*, 2020). O procedimento analítico consistiu em medir cerca de 2,5 g de amostra de *bacon* defumado em um tubo *falcon* de 50 mL e, em seguida, foram adicionadas 2,5 mL de água e 5 mL de acetonitrila acidificada com ácido acético 1% (v/v). Posteriormente, ao mesmo tubo foi adicionado 2,0 g de sulfato de magnésio anidro e 500 mg de sulfato de sódio anidro, e o tubo foi homogeneizado em vórtex por 60 s e centrifugado, por 3 min, a 4000 rpm. Cerca de 2 mL do sobrenadante foram transferidas para um tubo *falcon* de 15 mL, contendo 300 mg de sulfato de sódio anidro e 50 mg de C18. O tubo foi *homogeneizado*, em vórtex, e centrifugado, por 3 min, a 4000 rpm. O extrato foi derivatizado e analisado por CG-EM.

3.11 Amostras reais

Cinco amostras de *bacon* defumados de diferentes marcas foram adquiridas em comércio local. As amostras foram trituradas, submetidas à ESL-PBT e os extratos foram derivatizados com BSTFA e analisados por CG-EM.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESL-PBT

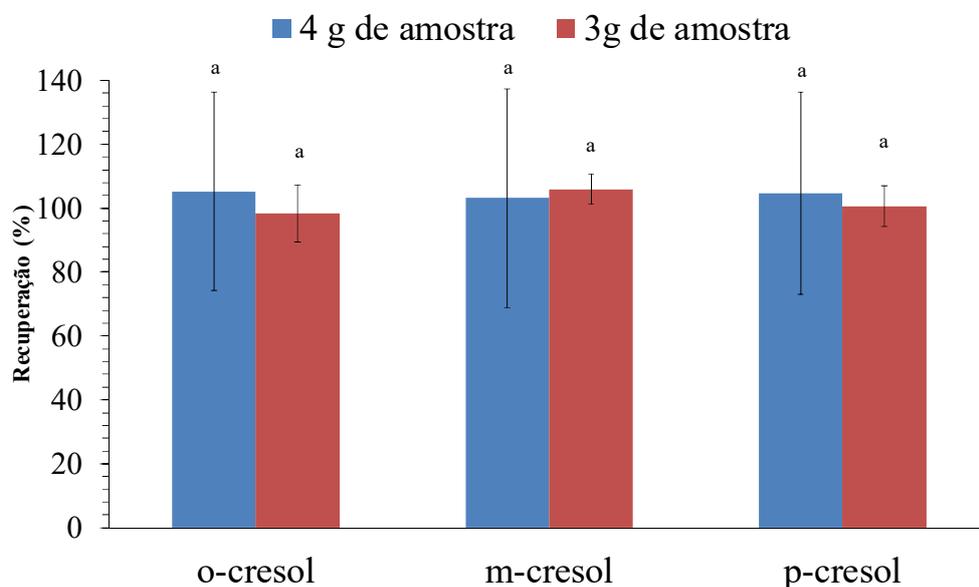
Amostras de *bacon* fresco foram usadas no desenvolvimento do método porque são livres de cresóis. As amostras foram aquecidas na fritadeira elétrica para que as suas características fossem semelhantes ao *bacon* defumado. Durante o aquecimento o *bacon* teve sua massa reduzida em 1,1%, devido à perda parcial de água e lipídeos no processo. Posteriormente, as amostras de *bacon* foram trituradas a fim de aumentar a superfície de contato durante o processo de fortificação/recuperação.

Durante a otimização da ESL-PBT foi mantida a proporção de água: solvente orgânico de 1:2, porque nessas condições a água e a acetonitrila foram miscíveis na presença dos componentes da matriz. O sistema foi constituído pela amostra sólida no fundo do *vial* e a mistura de solventes logo acima da amostra. Para obter recuperação satisfatória e limpeza adequada dos extratos, quatro parâmetros de ESL-PBT foram otimizados:

4.2 Massa de amostra

Na Fig.1 são apresentados os resultados para a recuperação dos cresóis utilizando 3,00 e 4,00 g de *bacon*. Não houve diferença estatística ($\alpha = 5\%$) na porcentagem de recuperação dos cresóis em ambas as massas, porém, os resultados para o DPR utilizando 3,00 g (DPR < 20%) foram mais satisfatórios do que usando 4,00 g de amostra (DPR > 40%). Trabalhos que utilizaram a ESL-PBT (Rodrigues *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2015; Freitas *et al.*, 2014; Rigueira *et al.*, 2013; Pinho *et al.*, 2010) demonstraram que a quantidade de massa de amostra otimizada é relativa e depende de cada matriz de interesse. Assim, pode-se observar que a massa é um parâmetro único de cada trabalho, sendo que massas elavadas podem proporcionar extrações com maiores quantidades de componentes da matriz, os quais inteferem diretamente na quantificação dos compostos (Zanzarini, 2023).

Figura 1- Valores de recuperação (%) obtidos no processo de otimização das ESL-PBT para quantidade de amostra de *bacon*

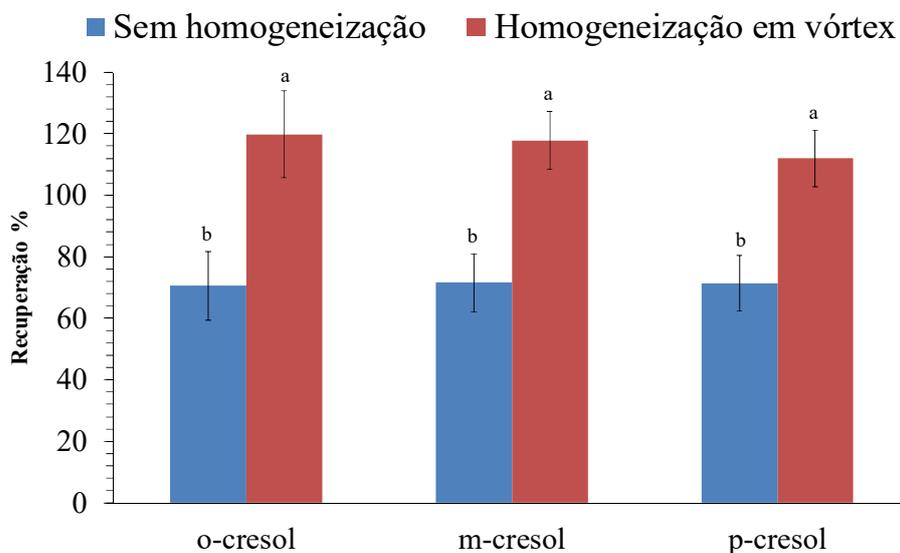


a = Médias seguidas por letras iguais não apresentam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de tukey.

4.3 Homogeneização da amostra com água

Foi observado que a homogeneização da amostra de *bacon* com 4 mL de água em vórtex, antes da adição da fase extratora, aumenta cerca de 50% a recuperação dos cresóis (Fig.2). Quando a água é homogeneizada com o *bacon*, a amostra apresenta uma formação de uma emulsão. Assim, para a formação de uma emulsão faz-se necessário a utilização de algum tipo de agitação (Alcantra; Lima; Abreu, 2022), o que indica que a utilização do vórtex favorece a sua formação, que conseqüentemente, resulta em melhores resultados, pois os cresóis são dispersos na emulsão e migram para acetonitrila.

Figura 2 - Valores de recuperação para homogeneização da amostra com água em vórtex



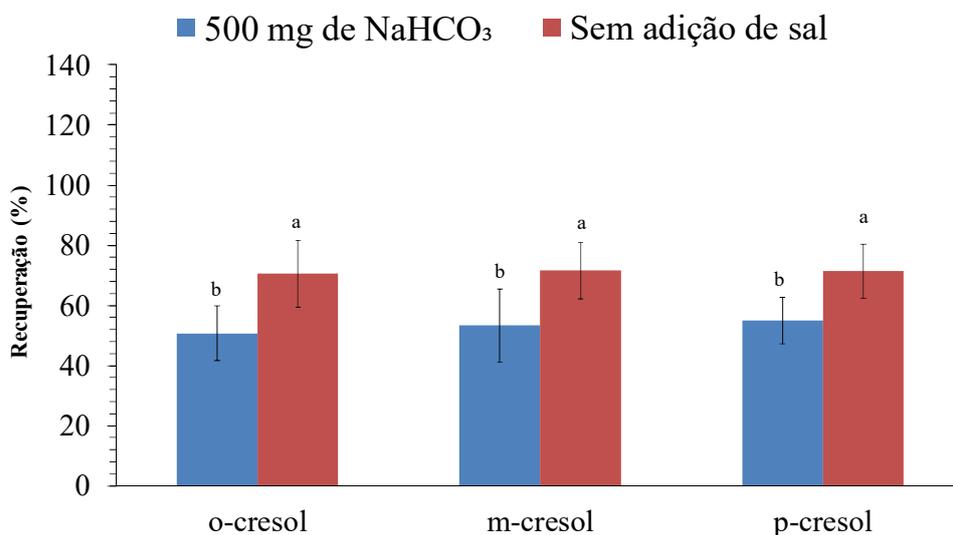
a, b = Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de tukey.

4.4 Força iônica

Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) é um sal que na presença de água sofre hidrólise e contribui para o aumento do pH do meio (pH 8,205). Dessa forma, a adição de NaHCO_3 pode influenciar tanto no pH quanto no aumento da força iônica durante a extração dos cresóis em amostras de *bacon*. A adição de sais para promover o efeito *salting out*, que tem sido muito utilizada e dependendo da natureza do solvente a partição obtém-se melhores resultados para analitos polares (Prestes *et al.*, 2009). Assim, a incorporação do NaHCO_3 sólido na amostra antes da adição de água e acetonitrila permite que a solubilização e hidrólise do sal ocorra diretamente em contato com a amostra. Embora a massa de 300 mg de NaHCO_3 seja totalmente solúvel em 4 mL de água, os resultados experimentais não foram satisfatórios, pois observou-se a presença de gotículas de triacilglicerol no solvente orgânico após o congelamento. Já a massa de 500 mg de NaHCO_3 , que é parcialmente solúvel em 4 mL de água, contribuiu para a formação de uma camada lipídica consistente logo acima da amostra congelada. Como pode ser observado na Fig.3, o NaHCO_3 diminuiu cerca de 20% a recuperação dos cresóis, pois ao adicionar o NaHCO_3 ocorreu a separação de fases, entre a fase orgânica e água, o que afeta diretamente a taxa de recuperação, visto que a separação de fases deveria ocorrer na etapa de congelamento, para que ocorra a migração dos compostos para a acetonitrila

(Mesquita *et al.*,2017). A formação da camada lipídica também afeta a passagem dos compostos para a fase orgânica, pois, ela forma uma barreira entre as fases. Portanto, optou-se por não adicionar sal no procedimento de extração.

Figura 3- Valores de recuperação para alteração da força iônica na água

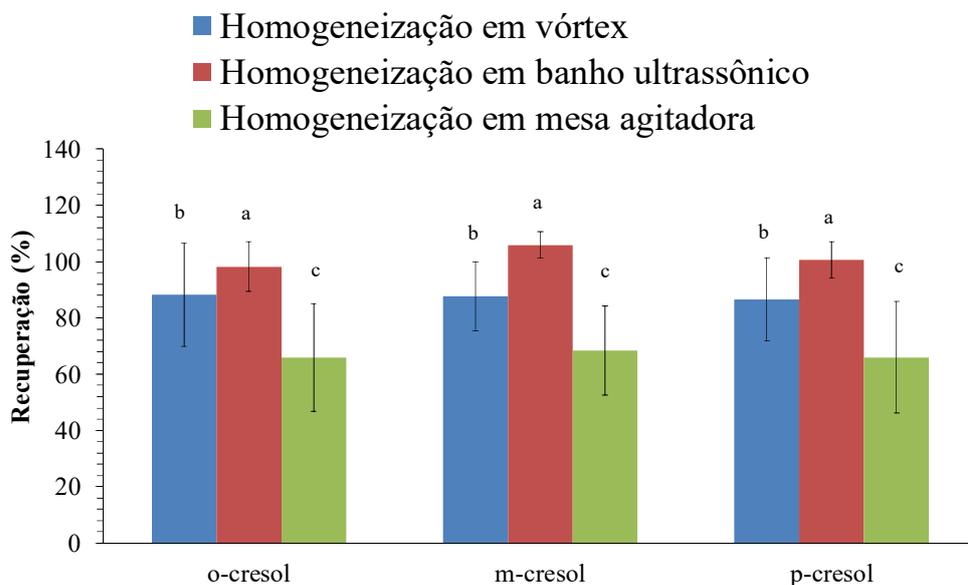


a, b = Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Tukey.

4.5 Homogeneização da amostra, água e acetonitrila

O tipo de homogeneização do sistema constituído pela amostra de *bacon*, água e acetonitrila foi determinante na recuperação dos cresóis, como pode ser observado na Fig.4. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de banho ultrassônico, com recuperação dos cresóis entre 90 e 105% e DPR inferior a 9%. Observou-se que as microbolhas geradas durante o processo de homogeneização reduziram o tamanho dos grumos da amostra aumentando a superfície de contato da amostra com a mistura de solvente extratores, o que possivelmente potencializa o processo de extração do analito. O banho ultrassônico é uma ferramenta poderosa para acelerar várias etapas do processo analítico, auxiliando no pré-tratamento de amostras sólidas, pois, acelera as operações de extração (Luque-García; Castro, 2003), além de promover a extração de elementos sedimentados e materiais particulados que estejam em suspensão (Menezes, 2020), o que, conseqüentemente, aumenta os valores de recuperação.

Figura 4- Valores obtidos para os testes de homogeneização em três tipos de homogeneizadores para a otimização das variáveis da ESL-PBT



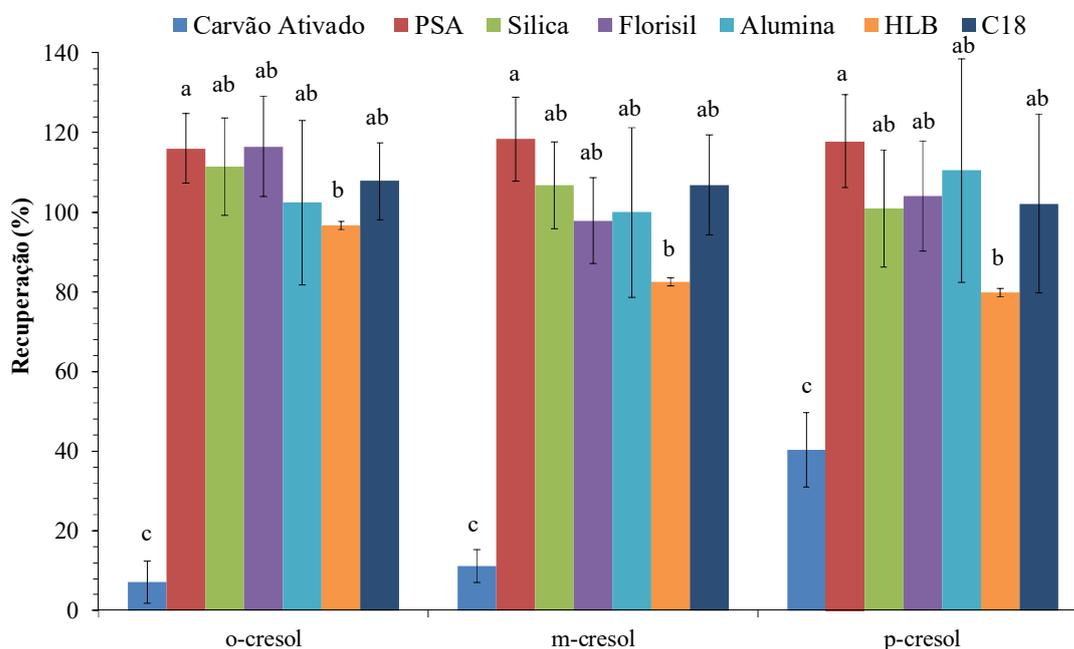
a, b, c = Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Durante a otimização foi observada que a homogeneização nos três equipamentos causava a formação de agregados lipídicos acima da mistura de solventes. Para resolver esse problema, logo após a homogeneização foi inserida uma etapa de centrifugação a 4000 rpm, por 5 min para acelerar a separação da camada lipídica, possibilitando sua remoção do sistema.

4.6 Sorventes

A ESL-PBT é uma técnica que possibilita a extração dos analitos-alvo e a limpeza dos extratos simultaneamente durante o congelamento da amostra com a água (Silvério *et al.*, 2012). Entretanto, o *bacon* é uma amostra complexa que apresenta elevado teor de lipídeos, sendo necessário avaliar uma etapa adicional de *clean up* dos extratos. O *clean up* com d-SPE consiste em adicionar um sorvente ao extrato para que os componentes da matriz sejam seletivamente retidos na superfície do sorvente, enquanto que os analitos alvo permaneçam solubilizados no extrato (Leite, 2018). Assim, foi avaliado, inicialmente, a retenção dos cresóis em sete sorventes na proporção de 25 mg de sorvente /mL de solução padrão de cresóis, a $50 \mu\text{g L}^{-1}$, em acetonitrila. Os resultados são apresentados na Fig.5.

Figura 5- Avaliação da adsorção de cresóis a 50 µg L⁻¹, em acetonitrila, em sete sorventes diferentes na proporção de 25 mg de sorvente/ mL de solução padrão. As análises de quantificação foram realizadas por CG-EM

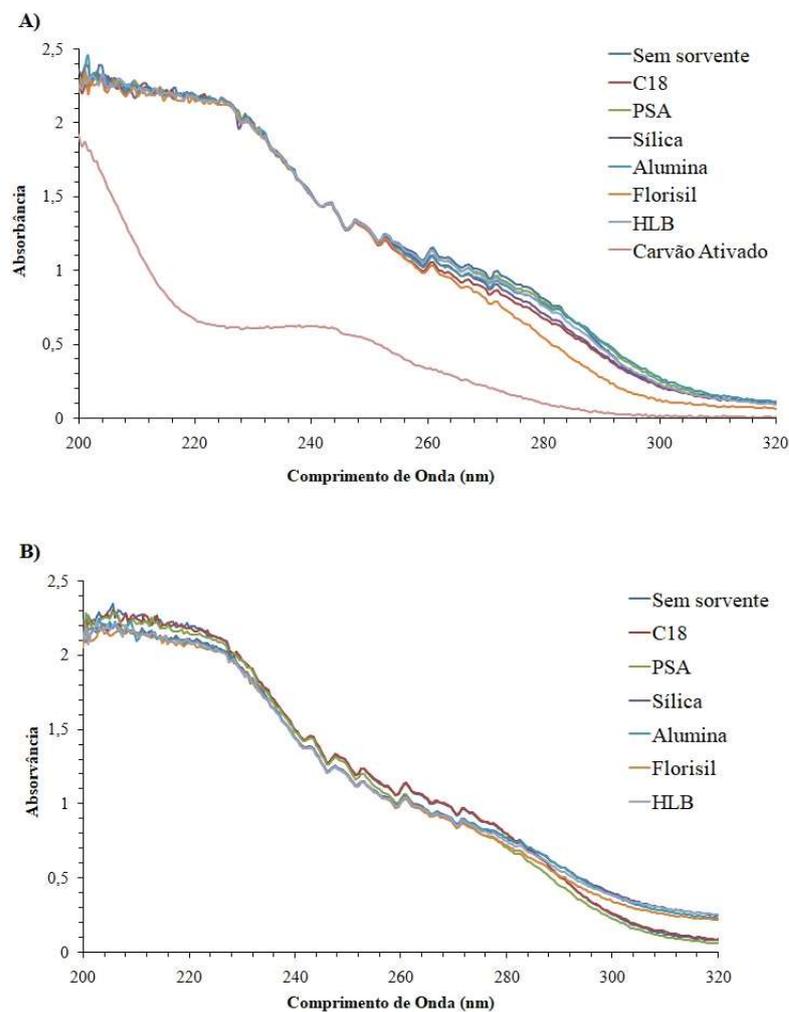


a, ab, b, c = Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de tukey.

Após as análises para a quantificação de cresóis por CG-EM, observou-se que o carvão ativado reteve de 60 a 90% dos cresóis em sua superfície, resultado em menores valores de recuperação (10 a 40%), não sendo, portanto adequado para a d-SPE. Estudos demonstram que o carvão ativado interage mais, favoravelmente, com cresol (Supong; Sinha; Sinha, 2022), justificando a adsorção dos mesmos. O sorvente sintético HLB também reduziu em cerca de 15% a recuperação dos isômeros *m*-cresol e *p*-cresol. Os sorventes C18, sílica, florisil, alumina e PSA não apresentaram tendência em adsorver os cresóis em solvente orgânico conforme observados nos valores de recuperação maiores ou iguais a 100% (Fig.5).

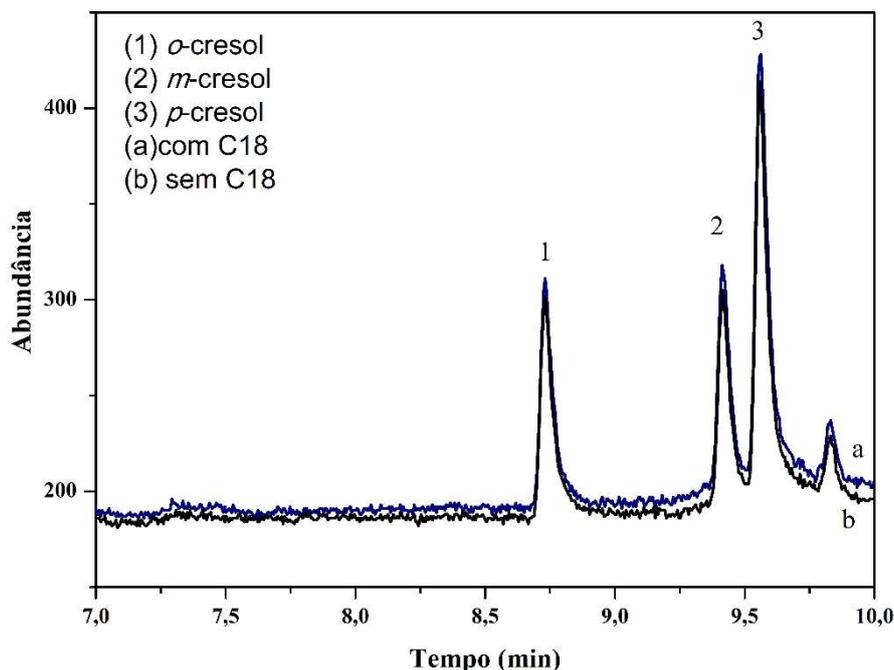
A limpeza dos extratos orgânicos de *bacon* pelos sorventes foi avaliada em espectrofotômetro na região do UV/Visível. Os resultados mostraram uma absorção intensa na região do ultravioleta ($\lambda < 320\text{nm}$) e somente o carvão ativado foi eficiente na remoção de componentes da matriz (Fig.6A). Os demais sorventes não apresentaram efetividade na limpeza dos extratos tanto na proporção 25 mg de sorvente/ mL de extrato de *bacon* (Fig.6A), quanto na proporção 50 mg/ mL (Fig.6B).

Figura 6- Espectros na região do UV/Vis dos extratos de baconapós limpeza com sorventes: (A) 25 mg de sorvente/ mL de extrato (B) 50 mg sorvente/ mL de extrato



O C18 é um sorvente, tradicionalmente, utilizado para a remoção de compostos lipofílicos por d-SPE (Lehotay *et al.*, 2005). Dessa forma, amostras de *bacon* foram fortificadas com os cresóis, submetidas à ESL-PBT e d-SPE com C18, derivatizadas e analisadas por CG-EM. Nessas condições os cresóis apresentaram recuperação entre 125 e 140% e DPR inferior a 10%. Deve-se destacar que nenhum benefício do uso de C18 foi observado no cromatograma (Fig. 7).

Figura 7- Cromatograma dos extratos de bacon fortificados obtidos a partir da ESL-PBT com e sem a d-SPE usando o sorvente C18



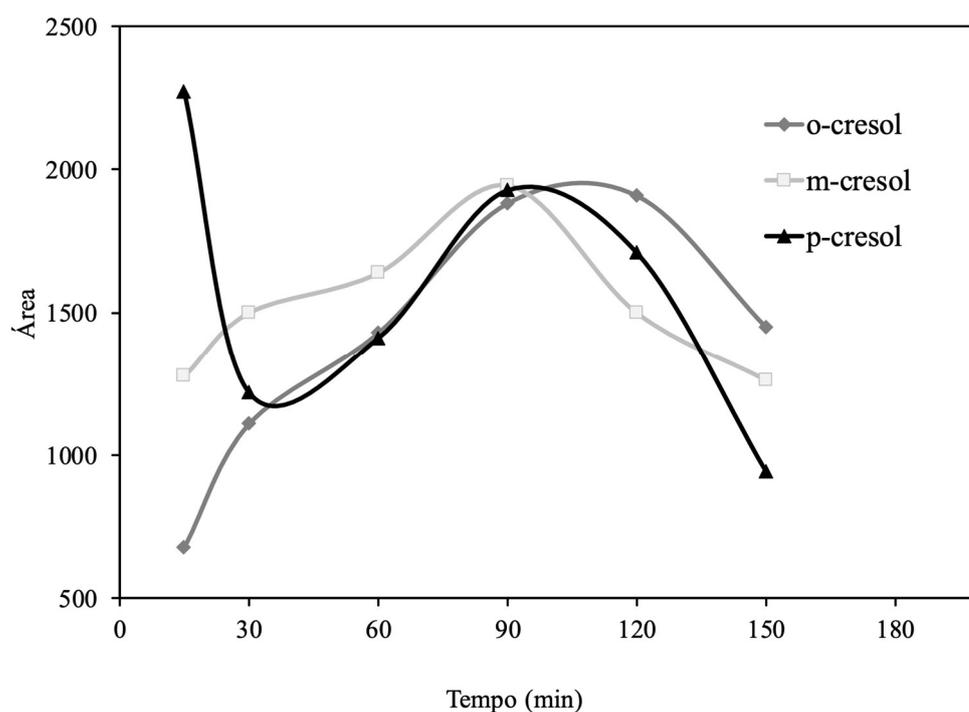
Dessa forma, torna-se evidente que a ESL-PBT foi adequada para extração dos analitos alvo e limpeza dos extratos simultaneamente sem a d-SPE.

4.7 Derivatização dos cresóis

Os cresóis são compostos que apresentam uma hidroxila em sua estrutura química, a qual interage com o sistema cromatográfico diminuindo a volatilização deles, e também favorece a coeluição dos isômeros *m* e *p*-cresol. Dessa forma, as análises dos cresóis por cromatografia em fase gasosa requerem, obrigatoriamente, uma etapa prévia de derivatização. A derivatização dos cresóis com anidrido acético levou à formação de compostos acetilados, possibilitando a separação dos isômeros *m*- e *p*-cresol, como pode ser visto no cromatograma apresentado na Fig.5. Entretanto, a derivatização com anidrido acético requer, obrigatoriamente, a presença de uma base para estabilização dos cresóis acetilados, como por exemplo, a piridina (Xu *et al.*, 2010) ou K_2CO_3 . Temos observado que o uso do K_2CO_3 é incompatível com a técnica de ESL-PBT e, não temos obtido sucesso nos resultados. Embora a derivatização dos cresóis com anidrido acético/piridina tenha proporcionado resultados satisfatórios, como por exemplo, estabilidade dos produtos da reação no período de 15 min a 150 min, praticidade do processo e $DRP <$

20%, a piridina introduziu um interferente no tempo de retenção do *p*-cresol. O sinal analítico do interferente comprometeu a seletividade do método bem como o LQ, mesmo trocando o frasco do reagente. Dessa forma, um estudo de derivatização dos cresóis foi realizado usando apenas BSTFA como reagente derivatizante, o qual foi baseado no trabalho descrito por Kavács *et al.* (2008). A proporção entre BSTFA e extrato orgânico de *bacon* foi decisivo para a etapa de derivatização. Nas condições ótimas, 50 µL de extrato orgânico são transferidos para o *insert* seguido pela adição de 130 µL de BSTFA. Volumes maiores de extratos levam à formação de um sistema bifásico além da projeção parcial da mistura para fora do *insert*, devido à uma reação altamente exotérmica. A derivatização dos cresóis foi acompanhada por análises cromatográficas no período de 0 a 150 min e, os resultados podem ser vistos na Fig.8.

Figura 8- Avaliação do tempo de derivatização dos três isômeros dos cresóis presentes em extratos de bacon com BSTFA em função do tempo de reação



As condições de derivatização dependem da temperatura e do tempo de reação (Schummer *et al.*, 2009). Como pode ser observado na Fig.7, há diferenças significativas nas áreas cromatográficas dos cresóis entre os tempos de reação de 15 a 150 min. Valores de áreas mais elevados foram obtidos com 90 min de reação para os três isômeros, simultaneamente. Segundo Kavács *et al.* (2008), a quantidade de agente de silição afeta diretamente a porcentagem de produto derivatizado, sendo observado que o excesso de

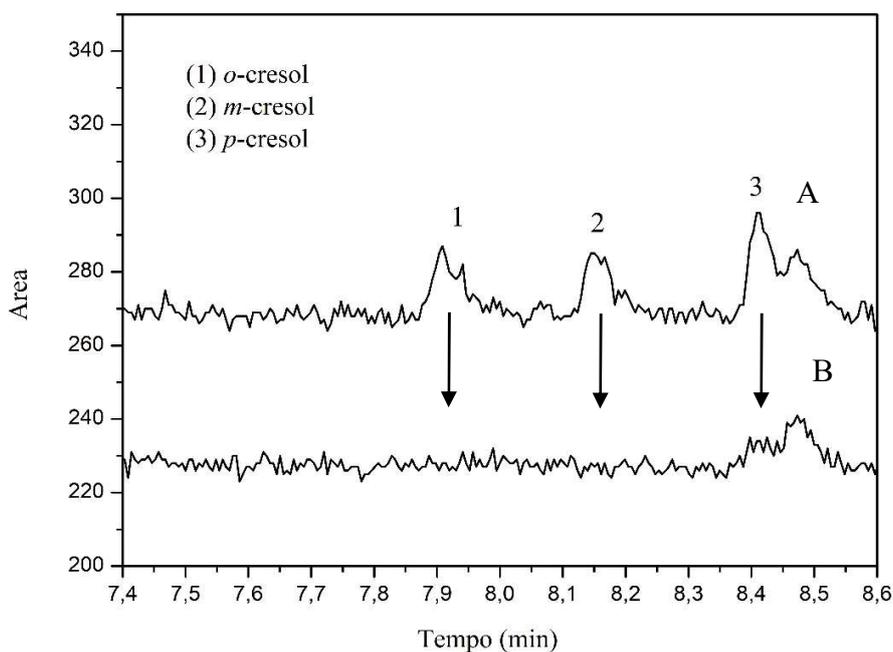
10 ou 100 vezes do agente de derivatização aumentou a porcentagem de compostos derivatizados, sendo a proporção de 100 vezes superior a mais eficaz, com estabilidade de 24 horas e reação instantânea. Além disso, na proporção 1:1 de agente de sililação e extrato, a taxa de reação é de 25% após 90 minutos (Kavács *et al.* 2008). No caso deste estudo, a quantidade de agente de sililação foi 2,6 vezes maior que a quantidade de extrato, resultando em um tempo de reação mais prolongado e de menor estabilidade

4.8 Validação

4.8.1 Seletividade

Como pode ser observado na Fig. 9, o método mostrou-se seletivo, pois não há sinais de interferências no mesmo tempo de retenção dos cresóis.

Figura 9- Cromatograma de extratos de bacon após a ESL-PBT, derivatização com BSTFA e análises por CG-EM



(A) Amostras de *bacon* fortificadas a $53,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ (B) Amostras de *bacon* não fortificadas

4.8.2 Limite de quantificação

O LQ dos cresóis foi definido como $53,3 \mu\text{g kg}^{-1}$, correspondendo a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ no extrato final. O cromatograma apresentado na Fig. 9 mostra os sinais analíticos para os

resóis nesta concentração. Além disso, o método tem se mostrado exato e preciso na concentração do LQ, como pode ser observado na Tabela 4. Oshiro *et al.* (2022) também obteve LQ de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o *p*-cresol em extratos orgânicos de amostras de hambúrguer utilizando o método QuEChERS. Vale ressaltar que, até o presente momento, não foi estabelecido um limite máximo para a presença de cresóis em alimentos.

Tabela 4 – Dados da validação da ESL-PBT de cresóis em amostras de *bacon* seguida pela análises por CG-EM

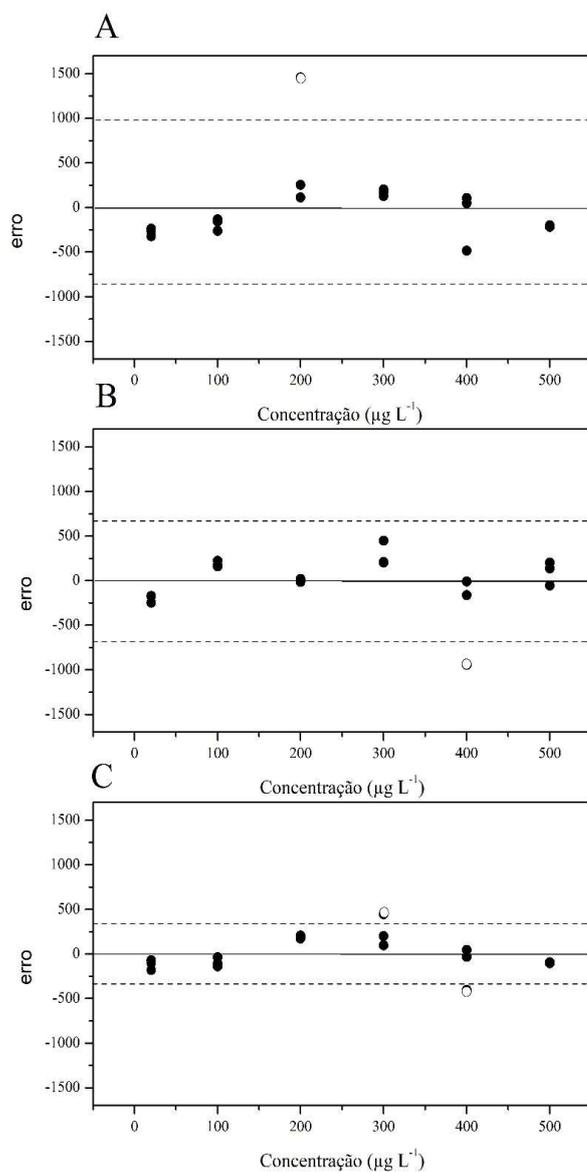
| Compostos | LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Faixa ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Linearidade | | Recuperação (%) \pm DPR* | | |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | | Equação | R ² | 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ | 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ | 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ |
| <i>o</i> -cresol | 20 | 20 - 500 | $Y_m = 8,345x - 415,6$ | 0,9917 | 98 \pm 3 | 90 \pm 9 | 98 \pm 3 |
| | | | $Y_s = 21,46x - 489,3$ | 0,9855 | | | |
| <i>m</i> -cresol | 20 | 20 - 500 | $Y_m = 10,48x + 320,8$ | 0,9902 | 96 \pm 13 | 91 \pm 7 | 105 \pm 3 |
| | | | $Y_s = 25,11x + 357,9$ | 0,9879 | | | |
| <i>p</i> -cresol | 20 | 20 - 500 | $Y_m = 10,85x + 940,6$ | 0,9910 | 116 \pm 6 | 96 \pm 9 | 99 \pm 3 |
| | | | $Y_s = 22,96x + 482,3$ | 0,9843 | | | |

*n=3 para 20 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e n=7 para 100 $m =$ matriz; $s =$ solvente

4.8.3 Linearidade

A resposta do detector foi linear para os três isômeros dos cresóis, quando as soluções padrão foram preparadas em extratos da matriz na faixa de concentração entre 20 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. O coeficiente de determinação (R^2) foi superior a 0,99, como pode ser observado na Tabela 4. O ajuste do modelo linear para as curvas analíticas preparadas no extrato da matriz foi avaliado pelo gráfico de resíduos (Fig. 10) e os *outliers* foram diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife.

Figura 10- Gráficos dos resíduos da regressão das curvas analíticas para o-cresol, m-cresol e p-cresol (20 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) em extrato de bacon, com outliers diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife, sendo a linha tracejada = $\pm t_{crit} (0,95; -p-1) * S_{res}$



(A) *meta*-cresol (B) *para*-cresol e (C) *orto*-cresol

4.9 Efeito de matriz

É possível observar pela Tabela 4 que o coeficiente angular da curva analítica preparada em extrato da matriz é inferior ao coeficiente angular da curva preparada em solvente puro. Claramente, os três cresóis apresentam efeito de matriz negativo, ou seja, a presença dos componentes da matriz diminui a resposta cromatográfica dos cresóis (Montigny *et al.*, 1998). Essa diminuição do sinal pode ocorrer devido à interação dos cresóis com sítios ativos do sistema cromatográfico (Lee *et al.*, 2017), tais como na entrada do injetor e na coluna cromatográfica (Cho *et al.*, 2017). O efeito de matriz calculado a partir da razão entre os coeficientes angulares foi de 61, 58 e 53% para *o*-cresol, *m*-cresol e *p*-cresol, respectivamente. Outro importante ponto a ser considerado é que os cresóis apresentam linearidade insatisfatória quando as soluções padrão são preparadas em acetonitrila ($R^2 \leq 0,98$). Esse resultado reforça a necessidade da quantificação dos cresóis ser realizada com a calibração na matriz.

4.10 Comparação entre métodos

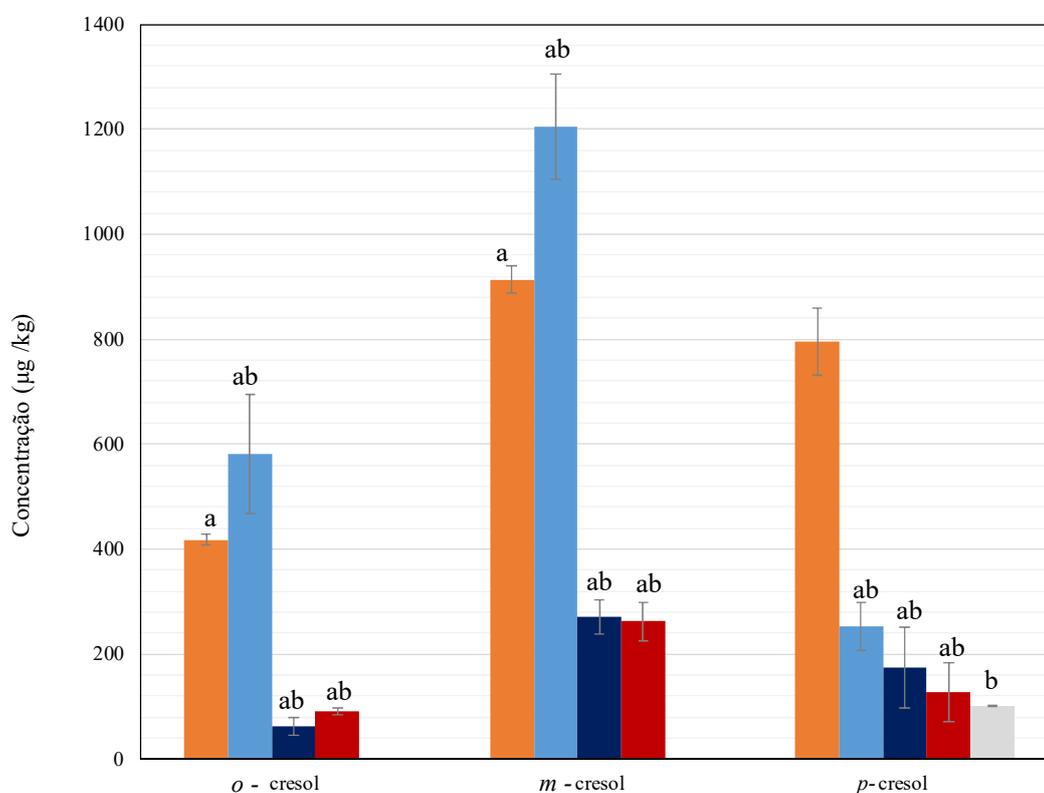
Não há na literatura nenhum método oficial de extração de cresóis em amostras de *bacon*. Entretanto, o método QuEChERS já foi utilizado para a extração de *p*-cresol em amostras de produtos cárneos defumados (Oshiro *et al.*, 2022), com recuperação superior a 70% e DPR inferior a 14%. Quando o mesmo método QuEChERS foi aplicado para a extração de cresóis em *bacon*, a recuperação foi de 81, 56 e 75% para *o*-cresol, *m*-cresol e *p*-cresol, respectivamente. Dessa forma, a ESL-PBT apresentou resultados mais satisfatórios, com recuperação de 90 a 96% e DPR inferior a 9% para a mesma concentração analisada. O método QuEChERS é um método bastante laborioso (Rodrigues *et al.*, 2018), por possuir etapas de pesagens, que dependem da calibração do pesquisador, podendo gerar erros durante o processo de extração. Por outro lado, a ESL-PBT é mais rápida e menos trabalhosa, com menos etapas e menor consumo de solvente orgânico (Rodrigues *et al.*, 2018).

4.11 Amostras Reais

Os cresóis foram quantificados nas cinco amostras de *bacon* defumado de diferentes marcas, identificadas como A1, A2, A3, A4 e A5. As concentrações foram determinadas utilizando os dados da curva de calibração em extratos da matriz (branco) e os valores variaram de 62 a 1204 $\mu\text{g kg}^{-1}$, como pode ser observado na Fig. 11. As diferenças nas concentrações podem ser atribuídas ao tempo e temperatura de defumação, tipo de

madeira usada na produção da fumaça e tecnologia usada no processamento industrial. Conforme apresentado na Figura 9, a maioria das amostras exibe níveis mais elevados de *m*-cresol, o que pode contribuir sobremaneira para o *flavor* de defumado da amostra. Geralmente, este mesmo composto é encontrado em abundância em fragrâncias e no *flavor* de produtos de limpeza (Del Olmo *et al.*, 1996). Em estudos para determinação de *p*-cresol em amostras de produtos cárneos defumados, os valores encontrados variavam de 148 a 872 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Oshiro *et al.*, 2022), o que se aproxima dos valores encontrados no presente estudo.

Figura 11- Concentração em $\mu\text{g kg}^{-1}$ dos três isômeros do cresol em diferentes amostras de bacon defumado. A extração foi realizada a partir da ESL-PBT e análise por CG-EM



a, ab, b = Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de tukey.

Das cinco amostras reais apresentadas, apenas dois isômeros nas amostras cinco (A5) estão abaixo do LQ, assim, não foi possível a quantificação de dois isômeros de cresóis, sendo eles o *orto e meta*-cresol para a amostra A5.

5 CONCLUSÃO

A ESL-PBT é uma técnica simples, fácil e rápida que apresenta ótimos resultados para a extração de o, m, p-cresol em amostras de bacon. Melhor seletividade do método foi alcançada com a derivatização dos cresóis com BSTFA antes das análises por GC-EM. A ESL-PBT apresentou resultados mais satisfatórios que o método QuEChERS. O método validado foi aplicado com sucesso na quantificação dos três isômeros de cresóis em cinco amostras de bacon defumado, variando de 62 a 1204 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Portanto, essas elevadas concentrações de cresóis em bacon defumado, associadas ao elevado consumo desse produto, podem ser motivo de preocupação mundial em saúde pública.

REFERÊNCIAS

- Agência Brasileira de Indústria de Alimentos – ABIA (2023) <https://abia.org.br/noticias/dia-do-bacon-brasil-produz-90-mil-toneladas-ao-ano> . Acesso em: 04 de jun.2023.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry- ATSDR (2022) Substance Priority List. U. S. Department of Health and Human Services: Atlanta. <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/#2017spl>. Acesso em: 23 de Maio. 2024.
- ALCANTARA, Ernandes Sávio Negreiros et al. Influência da velocidade de agitação na estabilidade de emulsões de quitosana com óleo de Eucalyptus Citriodora. **Open Science Research II**, v. 2, n. 1, p. 562-575, 2022.
- ANASTASSIADES, Michelangelo et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC international**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- ANDRIAMIHAJA, Mireille et al. The deleterious metabolic and genotoxic effects of the bacterial metabolite p-cresol on colonic epithelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 85, p. 219-227, 2015.
- AOAC INTERNATIONAL (2012) Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. https://s27415.pcdn.co/wp-content/uploads/2020/01/64ER20-7/Validation_Methods/c-aoc-validation-guidelines-for-food-microbiology.pdf. Acesso em: 04 de jun.2023.
- ARAÚJO, Emiliane Andrade et al. Determination of haloxyfop-methyl, linuron, and procymidone pesticides in carrot using SLE-LTP extraction and GC-MS. **Food analytical methods**, v. 9, p. 1344-1352, 2016.
- BRUSTOLIN, Adriane Pregararo. **Defumação Convencional e Líquida em Bacon**.2013. Tese de Doutorado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões.
- CHEIBUB, Ana Maria de Souza Santos; DE LYRA, Eduardo Silva Bahiense; NETTO, Annibal Duarte Pereira. Development and validation of a method for simultaneous determination of trace levels of five macrocyclic lactones in cheese by HPLC-fluorescence after solid–liquid extraction with low temperature partitioning. **Food chemistry**, v. 272, p. 148-156, 2019.
- CHO, Jimi et al. Quantification of pesticides in food crops using QuEChERS approaches and GC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 33, n. 12, p. 1803-1816, 2016.
- COSTA, Anna IG et al. Determination of pesticides in lettuce using solid–liquid extraction with low temperature partitioning. **Food chemistry**, v. 181, p. 64-71, 2015.
- COSTA, Anna Isabel Guido. **Análise multirresíduos de agrotóxicos em alface por cromatografia gasosa**. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.

DEL OLMO, M. et al. Resolution of phenol, o-cresol, m-cresol and p-cresol mixtures by excitation fluorescence using partial least-squares (PLS) multivariate calibration. **Analytica chimica acta**, v. 335, n. 1-2, p. 23-33, 1996.

DONZELLI NETO, João et al. Aplicação de metodologia QuEChERS para análise de alimentos. 2019.

DU, Hongzhen et al. Evaluation of flavor characteristics of bacon smoked with different woodchips by HS-SPME-GC-MS combined with an electronic tongue and electronic nose. **Meat Science**, v. 182, p. 108626, 2021.

DUAN, Weiyan et al. Ecotoxicity of phenol and cresols to aquatic organisms: a review. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 157, p. 441-456, 2018.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (2021) Defumação. <https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/tecnologia-de-alimentos/processos/grupos-de-alimentos/carneos/fabricacao-de-produtos-carneos/defumacao>. Acesso em: 04 de jun.2023.

EURACHEM (2012) Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf. Acesso em: 04 de jun.2023.

European Commission. 2021. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document N° SANTE/12682/2021.

FRANÇA, Jéssica A. et al. Simultaneous determination of prescription drugs, cocaine, aldicarb and metabolites in larvae from decomposed corpses by LC-MS-MS after solid-liquid extraction with low temperature partitioning. **Forensic Toxicology**, v. 33, p. 93-103, 2015.

FREITAS, Romenique da Silva de et al. Development of a solid-liquid extraction method with low-temperature partitioning for the determination of insecticides in ozonized maize grain. **Química Nova**, v. 37, p. 238-243, 2014.

GONÇALVES, Alex Augusto; PRENTICE-HERNÁNDEZ, Carlos. Defumação líquida de anchova (*Pomatomus saltatrix*): efeito do processamento nas propriedades químicas e microbiológicas. **Food Science and Technology**, v. 18, p. 438-443, 1998.

GUILLÉN, María D.; IBARGOITIA, María L. GC/MS analysis of lignin monomers, dimers and trimers in liquid smoke flavourings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 13, p. 1889-1903, 1999.

HARRISON, Mark A.; STRAHL, Henrik; DAWSON, Lisa F. Regulation of para-cresol production in *Clostridioides difficile*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 65, p. 131-137, 2022.

HELENO, Fernanda F. et al. Determination of fungicides in bell pepper using solid-liquid extraction with low temperature partitioning. **Microchemical Journal**, v. 148, p. 79-84, 2019.

Index Box Market Intelligence – INDEXBOX Market Intelligence Platform. Acesso em: 04 de jun.2023

Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial – IMETRO (2020) Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/cgcre/doq/doq-cgcre-8_09.pdf . Acesso em: 04 de jun.2023

KADIA, Apurva; CHHAYA, Urvish. Aerobic Granulation Technology as an Emerging Strategy to Mitigate Cresol Pollution in Wastewater: A Review. **Environmental Processes**, v. 10, n. 4, p. 58, 2023.

KATAOKA, Hiroyuki; SAITO, Keita. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 54, n. 5, p. 926-950, 2011.

KNAPP, Daniel R. **Handbook of analytical derivatization reactions**. John Wiley & Sons, 1979.

KOSTYRA, Eliza; BARYŁKO-PIKIELNA, Nina. Volatiles composition and flavour profile identity of smoke flavourings. **Food Quality and Preference**, v. 17, n. 1-2, p. 85-95, 2006.

KOVÁCS, Ágnes et al. Determination of phenols and chlorophenols as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1194, n. 1, p. 139-142, 2008.

LEE, Jonghwa et al. Rapid and simultaneous analysis of 360 pesticides in brown rice, spinach, orange, and potato using microbore GC-MS/MS. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 16, p. 3387-3395, 2017.

LEHOTAY, Steven J.; MAŠTOVSKÁ, Kateřina; LIGHTFIELD, Alan R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 615-629, 2005.

LEITE, Victor dos Santos Azevedo Leite. Extração em fase sólida dispersiva para a determinação de cromo (VI) em água utilizando hidróxidos duplos lamelares intercalados com aminoácidos como adsorventes. 2018.

LEVEY, A. S. et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives—a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. **Kidney international**, v. 72, n. 3, p. 247-259, 2007.

LINGEMAN, Henk; HOEKSTRA-OUSSOREN, Sacha JF. Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean-up in bioanalysis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 689, n. 1, p. 221-237, 1997.

LIU, W. C.; TOMINO, Y.; LU, K. C. Impacts of indoxyl sulfate and p-cresol sulfate on chronic kidney disease and mitigating effects of AST-120. *Toxins (Basel)* 2018; 10: 367.

LORES, M.; CABALEIRO, O.; CELA, R. Post-column photochemical derivatization in high-performance liquid chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 392-400, 1999.

LUQUE-GARCIA, J. L.; DE CASTRO, MD Luque. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MAGALHÃES, Elisângela Jaqueline et al. Determination of cocaine in postmortem human liver exposed to overdose. Application of an innovative and efficient extraction/clean up procedure and gas chromatography–mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1309, p. 15-21, 2013.

Market research company, reports and consulting services – IMARC. <https://www.imarcgroup.com/> . Acesso em: 04 de jun.2023.

MARTHE, Deyse de Brito et al. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretroides em manteiga. **Química Nova**, v. 33, p. 1389-1393, 2010.

MARTINS, Manoel Leonardo et al. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações. 2012.

MENEZES, Bruno Bernardes de et al. Extração do inseticida carbaril em casca e polpa de banana. 2020.

MESQUITA, Tayane CR et al. Easy and fast extraction methods to determine organochlorine pesticides in sewage sludge, soil, and water samples based at low temperature. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 53, n. 3, p. 199-206, 2018.

Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (2023) Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bacon ou Barriga Defumada. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-sda-n-748-de-8-de-fevereiro-de-2023-463362936> . Acesso em: 04 de jun.2023.

MONTIGNY, C.; LESPES, Gaetane; POTIN-GAUTIER, M. Matrix effects and selectivity of the detector in the determination of butyl-and phenyltins by gas chromatography–flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 819, n. 1-2, p. 221-230, 1998.

MUNEKATA, Paulo ES et al. (Ed.). **Pork: Meat Quality and Processed Meat Products**. CRC Press, 2021.

OJEDA, M. et al. Chemical references in sensory analysis of smoke flavourings. **Food chemistry**, v. 78, n. 4, p. 433-442, 2002.

O'KEEFE, Stephen JD. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 13, n. 12, p. 691-706, 2016.

OSHIRO, Susane et al. p-Cresol in cheese: Is it a flavouring compound or chemical contaminant?. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 37, n. 9, p. 1510-1519, 2020.

OSHIRO, Susane; SILVÉRIO, Flaviano; PINHO, Gevany. Determination of p-cresol levels in smoked meat products using QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 57, n. 10, p. 796-803, 2022.

- PENG, Jianlin et al. High-resolution separation performance of poly (caprolactone) diol for challenging isomers of xylenes, phenols and anilines by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1466, p. 148-154, 2016.
- PEREIRA, Emanuele Graciosa et al. Potential use of wood pyrolysis coproducts: A review. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 41, n. 1, p. e13705, 2022.
- PERSICO, Antonio M.; NAPOLIONI, Valerio. Urinary p-cresol in autism spectrum disorder. **Neurotoxicology and teratology**, v. 36, p. 82-90, 2013.
- PINHO, Gevany Paulino et al. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food control**, v. 21, n. 10, p. 1307-1311, 2010.
- PRESTES, Osmar D. et al. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.
- QUEIROZ, Sonia CN; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel CSF. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.
- RIGLING, Marina et al. Characterization of the aroma profile of food smoke at controllable pyrolysis temperatures. **Separations**, v. 10, n. 3, p. 176, 2023.
- RIGUEIRA, Leila et al. Determination of chlorpyrifos and thiamethoxam in potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) and soil of Brazil using solid-liquid extraction with low temperature partitioning (SLE/LTP). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 2042-2049, 2013.
- RODRIGUES, Rogério P. et al. Otimização da extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para determinação de carbofurano em cucurbita pepo l (“abobrinha”) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 41, n. 2, p. 213-218, 2018.
- RONG, Yan; KIANG, Tony KL. Characterizations of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes in the conjugation of p-cresol. **Toxicological Sciences**, v. 176, n. 2, p. 285-296, 2020.
- ROSA, Lara Marcelo César. **Determinação dos agrotóxicos procimidona, haloxyfop-metil e linuron em cenoura por ESL-PBT e CG-MS**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.
- ROZSYPAL, Tomas; ZITOVA, Kristyna; MRAVCOVA, Ludmila. Overcoming the BSTFA: Study on Trimethylsilylation Derivatization Procedures for Chemical Weapons Convention-Related Alcohols in Field Analysis. **Analytical Letters**, p. 1-17, 2023.
- SAITO, Yuki et al. Identification of phenol-and p-cresol-producing intestinal bacteria by using media supplemented with tyrosine and its metabolites. **FEMS microbiology ecology**, v. 94, n. 9, p. fiy125, 2018.
- SANDERS, J. M. et al. Carcinogenesis studies of cresols in rats and mice. **Toxicology**, v. 257, n. 1-2, p. 33-39, 2009.

SCHUMMER, Claude et al. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Talanta**, v. 77, n. 4, p. 1473-1482, 2009.

SEGURA, Jordi; VENTURA, Rosa; JURADO, Carmen. Derivatization procedures for gas chromatographic–mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 713, n. 1, p. 61-90, 1998.

SHISHOV, Andrey; GAGARIONOVA, Svetlana; BULATOV, Andrey. Deep eutectic mixture membrane-based microextraction: HPLC-FLD determination of phenols in smoked food samples. **Food chemistry**, v. 314, p. 126097, 2020.

SILVÉRIO, Flaviano Oliveira et al. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, p. 2052-2056, 2012.

SOKAMTE, Tegang Alphonse et al. Characterization of volatile compounds of liquid smoke flavourings from some tropical hardwoods. **Scientific African**, v. 8, p. e00443, 2020.

SOUSA, Demetrio A. et al. Chemometric optimization of solid–liquid extraction with low-temperature partition (SLE-LTP) for determination of persistent organic pollutants in Caiman yacare eggs. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 266-272, 2014.

STUMPE-VĪKSNA, Ilze et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 794-797, 2008.

SUPONG, Aola; SINHA, Upasana Bora; SINHA, Dipak. Density functional theory calculations of the effect of oxygenated functionals on activated carbon towards cresol adsorption. **Surfaces**, v. 5, n. 2, p. 280-289, 2022.

TOREZAN, Raquel Fabian et al. Chemical and microbiological stability of bacon produced with natural smoking: A practical analysis aiming at improvements in the identity and quality standards. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29110716497, 2021.

VAKH, Christina et al. A novel flow injection chemiluminescence method for automated and miniaturized determination of phenols in smoked food samples. **Food Chemistry**, v. 237, p. 929-935, 2017.

XU, Chunlin et al. Acetylation and characterization of spruce (*Picea abies*) galactoglucomannans. **Carbohydrate research**, v. 345, n. 6, p. 810-816, 2010.

XU, Jiaxiang et al. Differentiation of isomeric cresols by silylation in combination with gas chromatography/mass spectrometry analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34, n. 3, p. e8576, 2020.

YANG, Yi et al. Chemical removal of m-cresol: a critical review. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 38, n. 8, p. 1023-1044, 2022.

YASHIKI, M. et al. Gas chromatographic determination of cresols in the biological fluids of a non-fatal case of cresol intoxication. **Forensic science international**, v. 47, n. 1, p. 21-29, 1990.

YIN, Xiaoyu et al. Influences of smoking in traditional and industrial conditions on flavour profile of harbin red sausages by comprehensive two-dimensional gas chromatography mass spectrometry. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1180, 2021.

ZANZARINI, Amanda Helena Pironi et al. Desenvolvimento, otimização e validação de metodologia para determinação de tiametoxam em folhas de feijoeiro. 2023.

PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2879>. Acesso: 23 de Maio de 2024.