

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**DETERMINAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM FASE
GASOSA DE AMINOÁCIDOS LIVRES EM SALAMES
SUBMETIDOS A ULTRASSOM**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jossiê Zamperetti Donadel

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**DETERMINAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM FASE
GASOSA DE AMINOÁCIDOS LIVRES EM SALAMES
SUBMETIDOS A ULTRASSOM**

Jossiê Zamperetti Donadel

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

Orientador: Prof. Dr. Roger Wagner

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos
Alimentos**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO POR CROMATOGRÁFIA EM FASE GASOSA DE
AMINOÁCIDOS LIVRES EM SALAMES SUBMETIDOS A
ULTRASSOM**

elaborada por
Jossie Zamperetti Donadel

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Roger Wagner, Dr.
(Presidente/Orientador)

Elizete Maria Pesamosca Facco, Pós-Dr. (UCS)

Alexandre José Cichoski, Dr. (UFSM)

Leila Queiroz Zepka, Dr.(UFSM)

Santa Maria, 12 de março de 2015.

DEDICATÓRIA

*Dedico este título a minha família,
especialmente aos meus amados pais Jomar e Girlei,
à minha querida irmã Tiéli,
à minha namorada Tiéle, meu grande amor.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de ingressar no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Ao CNPq e CAPES, pela bolsa de Mestrado e auxílio financeiro.

Ao estimado Prof. Dr. Roger Wagner, por me dar oportunidade de inicializar meus trabalhos na pesquisa científica ainda na graduação, e pelo seu exímio exemplo de empenho, dedicação, competência e amor pelo que faz, compreensão e paciência em me orientar, além de depositar sua confiança em meu trabalho. Obrigado por transmitir sua paixão pela análise de alimentos, aromas e, sobretudo, seus cromatógrafos, sem medir tempo e esforços para compartilhar seu conhecimento sobre esta área da pesquisa à qual eu era insipiente antes de ingressar na faculdade, além das palavras de conforto, alento e motivação nos momentos difíceis nestes últimos meses.

Aos professores e amigos do Curso de Tecnologia em Alimentos, em especial do Núcleo de Tecnologia em Alimentos, Juliano, Alexandre, Eduardo, Leila e Cristiano, por compartilharem seus equipamentos, ensinamentos, fornecimento de amostras e auxiliarem de uma maneira ou de outra, na execução do projeto, sem os quais não seria possível realizar as pesquisas.

Aos professores Alexandre, Leila Elizete por aceitarem o convite para participarem da banca avaliadora.

Às grandes amigas e colegas de laboratório: Tassiane, Raquel, Mariane, Stephanie e Bruna Klein, Andriéli e Bruna Tischer, pela amizade e pelo compartilhamento dos seus conhecimentos e ajuda no desenvolvimento das pesquisas, que me auxiliaram em algum momento no período da realização das técnicas, além dos momentos de descontração, alegria e satisfação, conversas e especialmente por sua amizade. Em especial ao querido amigo e colega Matheus Raschen, que agora brilha no céu, pois tivemos muitos momentos de alegria e diversão, juntamente com trabalho!

Aos amigos e funcionários da UFSM Carlos e Éder, pela disposição e pelos momentos de alegria, gargalhadas, regados a muita comida boa, café e dedos de prosa, deixando alguns dos meus momentos do dia menos estressantes.

Aos amigos, colegas e professores do NIDAL, principalmente a professora Claudia, dando auxílio com uma palavra amiga ou de cunho científico.

Ao meu pai Jomar, exemplo de bravura e amor pela profissão, por aquilo que faz, e minha mãe Girlei, por suas orações e transmissão de boas energias. Obrigado pelo amor incondicional, pois vocês são o meu esteio, o alicerce e minha base para viver, sempre me mostraram que o maior legado que se pode deixar ao ser humano é a educação e “ser” humano, e por isso, consegui chegar até aqui, neste momento.

À minha namorada Tiéle, meu grande amor, minha companheira, pela compreensão, amor, carinho, paciência, motivação e apoio, pois sempre estive ao meu lado nas horas mais difíceis pelas quais passei e nas pequenas alegrias do dia a dia, as quais se tornavam momentos de extrema felicidade ao seu lado.

À minha irmã Tiéli, pelas palavras de apoio e ajuda nos momentos angustiantes por que passei, pelo apoio, carinho, auxílio e pela palavra amiga.

A todos que, de alguma maneira, colaboraram para a realização deste trabalho.

Á Deus, por ter me dado luz, forças e me guiado nessa caminhada.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Centro de Ciências Rurais
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO POR CROMATOLOGRAFIA EM FASE GASOSA DE AMINOÁCIDOS LIVRES EM SALAMES SUBMETIDOS A ULTRASSOM

AUTOR: JOSSIÊ ZAMPERETTI DONADEL
ORIENTADOR: ROGER WAGNER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de Março de 2015.

Os aminoácidos são compostos orgânicos abundantes em tecidos animais, sobretudo em carne e produtos cárneos, na forma livre ou de polímeros, participando de reações bioquímicas, podendo ser precursores de compostos de interesse no controle de qualidade destes alimentos. O objetivo do presente trabalho foi otimizar e validar um método para determinação de aminoácidos livres por cromatografia em fase gasosa em salame tipo Italiano submetido a banho ultrassônico por 3, 6 e 9 min. Os aminoácidos livres foram avaliados na massa de salame não fermentada/maturada (tempo inicial), no produto acabado (28 dias) e após 120 dias da fabricação. A extração dos analitos foi realizada com a utilização de HCl 0,1 N. Uma alíquota das amostras foram submetidas à secagem a vácuo seguida de derivatização com MTBSTFA, a qual foi otimizada em relação ao tempo, temperatura e solventes de reação (piridina e acetonitrila). As condições instrumentais e cromatográficas de temperatura do injetor, pressão constante e programação de temperatura da coluna foram otimizadas para garantir a seletividade e eficiência do método. O emprego da mistura de acetonitrila/MTBSTFA na proporção de 1:1 (v/v), utilizando a temperatura de 100 °C por 2 h promoveu a derivatização de todos os L- aminoácidos contidos nos padrões analíticos. A temperatura do injetor a 320 °C e pressão constante de 15 psi proporcionou a melhor na eficiência na transferência de massa dos analitos para coluna, proporcionando também maior resolução e precisão. Os coeficientes de determinação obtidos para os aminoácidos foram maiores que 0,99, com exceção da glicina (0,98). Quatorze aminoácidos apresentaram faixa linear entre 1,0 – 160,0 µg mL⁻¹, com LOD e LOQ variando entre 0,3 e 10 µg mL⁻¹ e 1 e 20 µg mL⁻¹ e precisão intra-dia com coeficientes de variação menores que 15% para a maioria dos analitos. O aumento nas concentrações da maioria dos aminoácidos foi observado com decorrer do tempo do processamento/armazenamento, indicando que houve uma intensa atividade proteolítica com liberação de aminoácidos livres. No produto pronto (28 dias), os tratamentos com ultrassom afetaram significativa (p<0,05) a concentração de alguns aminoácidos. Nesse ponto, os aminoácidos alanina, glicina, valina, leucina, prolina e metionina (apolares) e tirosina (polar sem carga) apresentaram concentrações inferiores ao controle, por outro lado foi observado um aumento dos de ácido glutâmico e arginina. Os aminoácidos livres encontrados nas amostras de salame são compostos importantes, pois através de reações químicas de descarboxilação ou desaminação podem ser precursores de compostos voláteis responsáveis pelo sabor/aroma característicos do produto cárneo processado. Dessa forma, o emprego de técnicas analíticas não convencionais, como a cromatografia em fase gasosa, para a determinação de aminoácidos livres, permite a obtenção de informações de grande importância no controle de qualidade e desenvolvimento de produtos, correlacionando as propriedades tecnológicas e nutricionais com as propriedades sensoriais que envolvem os aminoácidos como precursores.

Palavras-chave: aminoácidos, cromatografia a gás, validação de métodos, derivatização, ultrassom.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

AMINO ACIDS DETERMINATION BY GAS CHROMATOGRAPHY IN SALAMI SUBJECTED TO ULTRASOUND PROCEDURE

AUTHOR: JOSSIÊ ZAMPERETTI DONADEL
ADVISOR: ROGER WAGNER

Date and Defense Place: Santa Maria, March 12, 2015.

Amino acids are organic compounds abundant in animal tissues, especially in meat and meat products, in free form or polymers, participating in biochemical reactions and may be precursors of compounds of interest in the quality control of these foods. The aim of this study was to optimize and validate a method for determination of free amino acids by gas chromatography in Italian dry fermented sausage subjected to ultrasonic bath for 3, 6 and 9 min. Free amino acids were evaluated in salami pieces fermented/seasoned (initial time), at finished product (28 days) and 120 days after manufacture. The extraction was performed using 0.1 N HCl. An aliquot of samples were subjected to vacuum drying, followed by derivatization with MTBSTFA, which has been optimized with respect to time, temperature and reaction solvents (pyridine and acetonitrile). The instrumental and chromatographic conditions of injector temperature, constant pressure and column temperature program was optimized to ensure the method selectivity and efficiency. The use of a mixture of acetonitrile/MTBSTFA in the ratio 1:1 (v/v) using a temperature of 100 °C for 2 h promoted derivatizing all L-amino acids contained in the analytical standards. The injector temperature of 320 °C and 15 psi constant pressure gave the best efficiency in mass transfer of the analytes into the column, while also providing higher resolution and accuracy. The determination coefficients obtained for amino acids were higher than 0.99, except for glycine (0.98). Fourteen amino acids showed a linear range of from 1.0 to 160.0 mg L⁻¹ with LOD and LOQ ranged between 0.3 and 10 g ml⁻¹ and 1 and 20 mg L⁻¹ and inter-day coefficients of variation accurately less than 15% for most analytes. The increase in the concentrations of most amino acids was observed over time processing/storage, indicating that there was an intense proteolytic activity with the release of free amino acids. In the finished product (28 days), treatment with ultrasound affected significantly (p <0.05) concentration of some amino acids. At this point, the amino acids alanine, glycine, valine, leucine, proline and methionine (non-polar) and tyrosine (polar uncharged) showed lower concentrations to control, on the other hand there was an increase of glutamic acid and arginine. The free amino acids found in salami are important compounds because through chemical reactions of decarboxylation or deamination can be precursors of volatile compounds responsible for characteristic processed meat product flavor/aroma. Thus, the employment of no conventional analytical techniques such as gas chromatography for determination of free amino acids allows obtaining information of great importance for the quality control and product development, correlating the technological and nutritional properties with the properties sensory involving amino acids as precursors.

Key words: free amino acids, gas chromatography, method validation, amino acids derivatization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do mecanismo geral da sililação.....	27
Figura 2 - Separação cromatográfica em GC-FID da mistura de padrões (160 µg mL ⁻¹) contendo os 22 aminoácidos estudados.....	49
Figura 3 - Separação cromatográfica em GC-FID de aminoácidos livres em salame fermentado/maturado (28 dias)	50
Figura 4 - Teor de aminoácidos nos diferentes tratamentos de aplicação de ultrassom durante as etapas do processamento e estocagem.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas dos aminoácidos	20
Tabela 2 - Delineamento Composto Central 2 ²	43
Tabela 3 - Áreas dos analitos a diferentes temperaturas do injetor do GC	47
Tabela 4 - Áreas médias dos aminoácidos derivatizados por 1, 2 e 3h a 100 °C	51
Tabela 5 - Tempo de retenção (Tr), equação da regressão linear e coeficientes de determinação das curvas analíticas dos aminoácidos analisados por GC-FID	54
Tabela 6 - Ensaio de precisão para os 22 derivados de aminoácidos (n=6)	55
Tabela 7 - Teor de aminoácidos livres (mg 100 g ⁻¹) em massas de salames controle e tratados com ultrassom (3, 6, 9 min) no tempo inicial	57
Tabela 8 - Teor de aminoácidos livres (mg 100 g ⁻¹) em salames controle e tratados com ultrassom (3, 6, 9 min) em 28 dias de processamento	59
Tabela 9 - Teor de aminoácidos livres (mg 100 g ⁻¹) em salames controle e tratados com ultrassom (3, 6, 9 min) em 120 dias após processamento	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

Ala - Alanina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AQC - Aminoquinolil-6-carbamato de N-hidroxisuccinimidil do inglês *Aminoquinolil 6-carbamate of N-hydroxysuccinimidyl*

Arg - Arginina

Asn - Asparagina

Asp–Ácido aspártico

BSA – N,Obis (trimetilsilil) acetamida do inglês *N,Obis (trimethylsilyl) acetamide*

BSTFA - N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida do inglês *N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide*

–COOH – Grupo funcional carboxila

CV – Coeficiente de variação

Cys - Cisteína

Cys-Cys - Cistina

FMOC - 9-cloroformato de fluorenilmetil do inglês *99-fluorenylmethyl chloroformate*

GC - Cromatografia gasosa do inglês *Gas chromatography*

GC/MS - Cromatógrafo à gás acoplado a um espectrômetro de massas do inglês *Gas Chromatograph equipped with a Mass Spectrometry*

GC-FID – Cromatógrafo à gás equipado com detector de ionização em chama do inglês *Gas Chromatograph equipped with a Flame Detector*

Gln - Glutamina

Glu – Ácido glutâmico

Gly - Glicina

HCl - Ácido clorídrico do inglês hydrochloric acid

His - Histidina

HMDS – Hexametilsililazano do inglês hexamethylsilylazano

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência do inglês *High Performance/Pressure Liquid Chromatography*

Hpro - Hidroxiprolina

IEC - Cromatografia de troca iônica do inglês *Ion exchange chromatography*

Ile - Isoleucina

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISOC – Isoctano

Leu - Leucina

LOD – Limite de detecção do inglês *Limit Of Detection*

LOQ – Limite de quantificação do inglês *Limit Of Quantification*

Lys - Lisina

Met - Metionina

MSTFA - N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida do inglês *N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide*

MTBSTFA – N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida do inglês *N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide*

–NH - Grupo funcional amina

Nle - Norleucina

–OH - Grupo funcional álcool

OPA - Orto-ftaldeído do inglês *ortho-phthaldehyde*

pH – Potencial hidrogeniônico

Phe – Fenilalanina

PI – Padrão interno

PI – Ponto isoelétrico

PITC - Isotiocianato de fenil do inglês *phenyl isothiocyanate*

Pro - Prolina

PTFE – Politetrafluoretileno do inglês *polytetrafluoroethylene*

R² – Coeficiente de correlação

RSD – Desvio padrão relativo do inglês *Deviation Standard Relative*

Ser - Serina

–SH – Grupo funcional tiol

SIM - Monitoramento de íon selecionado do inglês *Selected Ion Monitoring*

TBDMCS - Tert-butil(dimetil)clorosilano do inglês *tert-Butyldimethylchlorosilane*

t-BDMS - terc-butil(dimetil)silil do inglês *tert-butyl (dimethyl) silyl*

TBDMSIM - N-tert-butil(dimetil)sililimidazol do inglês *N-tert-butyl (dimethyl) silylimidazole*

Thr - Treonina

TMCS – Trimetilclorosilano do inglês *trimethylchlorosilane*

TMS - Trimetilsilil do inglês *trimethylsilyl*

TMSIM - N-trimetilsililimidazol do inglês *N-trimethylsilylimidazole*

Trp - Triptofano

Tyr - Tirosina

US – Ultrassom

Val - Valina

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Áreas obtidas com a utilização de piridina e acetonitrila em diferentes temperaturas de derivatização	80
---	-----------

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1 REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1 Química dos aminoácidos	19
1.2 Determinação de aminoácidos livres em alimentos	21
1.3 Derivatização	22
1.3.1 Derivatização em cromatografia em fase gasosa	23
1.3.1.1 Alquilação	24
1.3.1.2 Acilação	24
1.3.1.3 Sililação	25
1.4 Validação de métodos cromatográficos	27
1.4.1 Seletividade	28
1.4.2 Curva analítica e linearidade	28
1.4.3 Precisão	30
1.4.4 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)	31
1.5 Aplicações da análise de aminoácidos em produtos cárneos	32
1.6 Ultrassom na indústria de alimentos	34
2 OBJETIVOS	35
2.1 Gerais	35
2.2 Específicos	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Reagentes, solventes e materiais utilizados	36
3.2 Instrumentação analítica	37
3.3 Amostras	37
3.3.1 Produção dos Salames tipo Italiano	37
3.3.2 Sonicação	38
3.3.3 Fermentação e maturação dos salames	39
3.3.4 Armazenamento	39
3.4 Preparo das Soluções	40
3.5 Preparo das amostras	40

3.6 Extração dos aminoácidos livres	41
3.7 Desproteínização e derivatização dos aminoácidos livres	41
3.8 Análises Cromatográficas	42
3.9 Otimização das condições cromatográficas para determinação de aminoácidos	42
3.10 Otimização do procedimento de derivatização	43
3.10.1 Tempo e temperatura.....	43
3.10.2 Ensaio com Piridina	44
3.11 Validação do método	44
3.11.1 Seletividade.....	44
3.11.2 Linearidade.....	45
3.11.3 Precisão Intra-dia	45
3.11.4 LOD e LOQ	45
3.12 Análise estatística	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Otimização do sistema cromatográfico	46
4.1.1 Temperatura do injetor	46
4.1.2 Desempenho cromatográfico	47
4.2 Otimização do procedimento de derivatização	48
4.2.1 Tempo e temperatura.....	48
4.2.2 Ensaio com Piridina.....	51
4.3 Validação do método	52
4.3.1 Seletividade.....	52
4.3.2 Linearidade.....	53
4.3.3 Precisão	54
4.4 Determinação de aminoácidos em amostras reais de salame	56
4.4.1 Efeito do ultrassom na disponibilidade de aminoácidos livres em salames. 56	
4.4.2 Efeito do tempo de processamento	61
5 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

INTRODUÇÃO

Os aminoácidos são compostos orgânicos abundantes em tecidos animais, especialmente em carne e produtos cárneos e, normalmente, podem ser encontrados na forma livre ou em polímeros não peptídicos, peptídeos e proteínas (JIMÉNEZ-MARTÍN, 2012). O perfil de aminoácidos cárneos influencia diretamente o desenvolvimento do sabor dos produtos cárneos (CHIANG et al., 2007), intensificando a palatabilidade (BARYLKO-PIKIELNA, 2007) e servindo como precursores na formação de compostos voláteis responsáveis pelo odor/aroma (PINNA et al., 2013).

A determinação do teor de aminoácidos livres e/ou proteicos em produtos cárneos é uma informação importante para avaliar a qualidade durante e pós fabrico (CORDOBA et al., 1994; JURADO et al., 2007; KE LIU et al., 2009; MARTIN et al., 2001; PEREZ-PALACIOS et al., 2010). Desta forma, a mudança na formulação ou no processo de fabricação podem gerar impactos significativos no sabor dos produtos cárneos fermentados e/ou maturados, em consequência da dinâmica das alterações químicas e bioquímicas das quais os aminoácidos são o substrato (KECHAOU et al., 2009; STADTMAN, 2003). Dentre esses produtos, o salame é um produto cárneo que possui sabor e aroma característicos devido a essas alterações e pode ser comercializado em vários tipos diferentes, os quais caracterizam sua origem ou processo de obtenção, como salames tipo Italiano, Milano, Hamburguês, Friolano, Calabrês, Alemão e Napolitano, além do salaminho (BRASIL, 2000).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame Tipo Italiano (BRASIL, 2000a) visa fixar a identidade e as características mínimas de qualidade que deverá obedecer o produto cárneo denominado Salame. Desta forma, alguns parâmetros são estabelecidos para o salame Tipo Italiano, como a atividade de água (máx. 0,90), teores de umidade (máx. 35%), lipídeos (máx. 32%), proteína (mín. 25%) e carboidratos totais (máx. 4,0%). Desta forma, o salame é caracterizado por constituir uma matriz muito complexa e dependente da relação entre as mudanças físicas, químicas e bioquímicas nas frações protéica, lipídica e de carboidratos. Portanto, na etapa de maturação, ocorrem numerosas reações catalisadas pela atividade das enzimas endógenas da matéria prima, bem como pela atividade

enzimática microbiana, as quais determinam tanto a segurança alimentar quanto a qualidade sensorial do produto (ORDÓÑEZ et al., 1999; RÖDEL; STIEBING, 1998).

Diversas técnicas analíticas têm sido utilizadas para realizar a análise de aminoácidos, dentre as reportadas com maior frequência para determinações em produtos cárneos estão a cromatografia de troca iônica (IEC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia em fase gasosa (GC). A técnica de GC associada a diferentes detectores como o de espectrômetro de massas (GC/MS) e o de ionização em chama (GC-FID) apresenta um menor número de aplicações na literatura em relação as demais técnicas devido ao processo de derivatização moroso e instável. No entanto, novas substâncias utilizadas neste processo, como *tert*-butil(dimetil)clorosilano (TDMCS) e *N*-metil-*N*-(*tert*-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA) minimizam esses problemas devido aos derivados mais estáveis que contribuem para o aumento da robustez do método (JIMÉNEZ-MARTÍN, 2012; SOBOLEVSKY, 2003). A utilização dessa ferramenta analítica permite efetuar análises de alta resolução com custo relativamente baixo em relação a outras técnicas já conhecidas, além da possibilidade de separar eficientemente os analitos da matriz (MANDALAKIS; APOSTOLAKI; STEPHANOU, 2010).

Atualmente, novas tecnologias denominadas verdes ou limpas tem sido utilizadas para substituir as técnicas convencionais de extração e processamento em alimentos, com o objetivo de reduzir custos, consumo de água e energia e produção de efluentes e substâncias tóxicas (CHEMAT et al., 2011). Dentre essas técnicas, pode-se destacar o uso de ultrassom (US) (LEADLEY; WILLIAMS, 2008) por meio de banhos ultrassônicos ou sondas, sendo que essa tecnologia pode ser utilizada também em conjunto com outras técnicas de análise de alimentos. Em produtos cárneos a aplicação do ultrassom por até 4 minutos induz a ação proteolítica através da ativação do sistema calpaína devido à liberação de catepsinas dos lisossomos e de íons cálcio do retículo sarcoplasmático (JAYASOORIYA et al., 2007), contribuindo para aumentar a maciez da carne. A atividade enzimática de proteases também pode ser acelerada pelo aumento de temperatura que ocorre durante a exposição ao ultrassom (CHANDRAPALA et al., 2012; DICKENS et al., 1991). Outra consequência desse aquecimento é a desnaturação proteica, que poderia vir a contribuir para o amaciamento do músculo (JAYASOORIYA et al., 2007). Além disso, medições de velocidade de ultrassom têm sido utilizados para determinar a composição das misturas de carne crua (BENEDITO et al., 2001). No entanto, ainda

não há estudos sobre o efeito da atividade ultrassônica exercida diretamente na matriz em relação ao perfil de aminoácidos livres em produtos cárneos fermentados e maturados. Nesse sentido, o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação de aminoácidos livres em produtos cárneos permitirá a obtenção de informações de grande importância no controle de qualidade e desenvolvimento desses produtos. Dessa forma, permitindo relacionar com impactos nas propriedades tecnológicas, nutricionais e sensoriais nos produtos oriundos da aplicação de novas tecnologias, como o ultrassom.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Química dos aminoácidos

Os aminoácidos são monômeros fundamentais das proteínas, as quais são abundantes e funcionalmente diversas nos sistemas biológicos, sobretudo em vários alimentos, como produtos cárneos. Diversos tipos de aminoácidos são encontrados na natureza, entretanto, apenas 20 deles encontram-se continuamente nas proteínas na forma de isômeros L- aminoácidos e, por isso, são chamados de aminoácidos comuns ou padrão (LEHNINGER, 2006). Os 20 aminoácidos padrão apresentam em comum um grupo carboxila e um grupo amino unidos ao mesmo átomo de carbono (carbono α) e diferem-se uns dos outros por suas cadeias laterais ou grupos R, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, o que influencia na sua solubilidade em água. Nesse sentido, o conhecimento da estrutura dos aminoácidos é importante, pois é a partir de sua cadeia lateral que reagem entre si e com outras substâncias. Em alguns casos, os aminoácidos livres apresentam na molécula grupamentos funcionais, além dos grupamentos carboxílico e amino, que também podem ser submetidos a reações de derivatização para viabilizar sua determinação por métodos cromatográficos.

A classificação dos aminoácidos os categoriza em cinco grandes grupos baseados no grupamento R, são eles: grupo R alifáticos, também chamados apolares ou hidrofóbicos; grupo R aromático; grupo R não carregados, polares; grupo R carregado positivamente; grupo R carregado negativamente (LEHNINGER, 2006), conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Características físico-químicas dos aminoácidos

Aminoácidos	Símbolo	Letra	pka1 (α -COOH)	Pka2 (α -NH ₃ ⁺)	Pka3 (Grupo R)	PI	Peso Molecular	Solubilidade (g L ⁻¹)	Hidrofobicidade (ΔG_t , kcal/mol)*	Massa (D)
<i>Apolares</i>										
Glicina	Gly	G	2,34	9,60	-	5,98	75,10	249,90	0	57,60
Alanina	Ala	A	2,34	9,69	-	6,00	89,10	167,20	0,40	71,80
Valina	Val	V	2,29	9,62	-	5,96	117,10	58,10	1,70	99,14
Leucina	Leu	L	2,3	9,60	-	5,98	131,20	21,70	2,30	113,17
Isoleucina	Ile	I	2,36	9,68	-	6,02	131,20	34,50	2,50	113,17
Metionina	Met	M	2,28	9,21	-	5,74	149,20	56,20	1,70	131,21
Prolina	Pro	P	1,94	10,60	-	6,30	115,10	620,00	10	97,12
Fenilalanina	Phe	F	1,83	9,13	-	6,30	165,20	27,60	2,40	147,18
Triptofano	Trp	W	2,38	9,39	-	5,89	204,20	13,60	3,10	186,21
<i>Polares sem carga</i>										
Serina	Ser	S	2,2	9,15	-	5,58	105,10	422	-0,10	87,08
Treonina	Thr	T	2,21	9,15	-	5,68	119,10	13,20	0,40	101,11
Asparagina	Asn	N	2,02	8,80	-	5,41	132,10	28,50	-0,80	114,11
Glutamina	Gln	Q	2,17	9,13	-	5,65	146,10	7,20 (37°C)	-0,30	128,14
Tirosina	Tyr	Y	2,2	9,11	10,07	5,66	181,20	0,40	1,30	163,18
Cisteína	Cys	C	1,96	10,28	8,18	5,07	121,10	-	2,10	103,14
<i>Carregados</i>										
Lisina	Lys	K	2,18	8,95	10,53	9,74	146,2	739,00	-1,40	128,18
Arginina	Arg	R	2,17	9,04	12,48	10,76	174,2	855,60	-1,40	156,20
Histidina	His	H	1,82	9,17	6,00	7,59	155,2	-	0,20	137,15
Acido aspártico	Asp	D	1,88	9,60	3,65	2,77	133,1	5,00	-1,10	115,09
Acido glutâmico	Glu	E	2,19	9,67	4,25	3,22	147,1	8,50	-0,90	129,12

Fonte: DEMODARAN; PARK; FENNEMA (2010); *FAUCHERE; PLISKA (1983)

Cada reação iônica é definida por uma constante de acidez, K_a e um pK_a ($-\log K_a$). Todos os grupos α -carboxílicos dos 20 aminoácidos têm valores de pK_a próximos, mas diferentes (pK_a 2 a 3), o mesmo se observa para os grupos α -amino (pK_a 9 a 10). O ponto onde se observa o fim da liberação de prótons por parte do grupo carboxil é o ponto isoelétrico, pI , esse ponto possui um pH característico, onde se observa todo o aminoácido como íon dipolar, ou seja, a carga total é igual a zero. Dessa forma é importante conhecer os pK_a s dos diferentes aminoácidos para a melhor compreensão das reações físico-químicas que podem ocorrer nos procedimentos de extração, desproteíntização e derivatização, e conseqüentemente, na determinação desses compostos. Ademais, os grupos reativos, tais como amino, carboxila, sulfidril, fenol, hidroxila, tioéter, imidazol, e guanila, em aminoácidos livres e proteicos são capazes de sofrer reações químicas que são semelhantes às que ocorreriam se fossem ligados a outras moléculas orgânicas pequenas (DEMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

1.2 Determinação de aminoácidos livres em alimentos

Existem diferentes métodos para proporcionar a quebra das ligações peptídicas, tornando possível a determinação de aminoácidos proteicos em alimentos, entretanto, a hidrólise química é a mais utilizada e eficiente quando comparada a hidrólise enzimática. O procedimento de hidrólise química normalmente é realizado com solução de ácido clorídrico 6 mol L^{-1} a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 - 24h (FOUNTOULAKIS; LAHM, 1998; KRÁČMAR et al., 2000; NAIR et al., 1976). No entanto, para a determinação de aminoácidos livres o preparo da amostra normalmente envolve a etapa de solubilização dos analitos em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorídrico, então esta solução é filtrada, e muitas vezes eluída em cartucho de extração em fase sólida de exclusão molecular para reter interferentes de maior massa molecular. Aristoy e Toldrá (1991) estudaram a ação de três solventes diferentes para extração de aminoácidos livres (tampão fosfato $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e verificaram que ao utilizar o ácido clorídrico maiores recuperações foram obtidas em carne fresca suína e em presunto curado.

1.3 Derivatização

As determinações dos aminoácidos proteicos e/ou livres normalmente são realizadas em sistemas seletivos de separação que envolvem técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em fase gasosa (PEACE; GILANE, 2005). A HPLC é a técnica de maior aplicação em rotinas analíticas e pesquisas em alimentos. Para esta técnica, vários reagentes derivatizantes têm sido propostos a fim de assegurar a seletividade analítica e a detecção na região do ultravioleta e visível. A reação de derivatização pode ser realizada antes da análise ou *on-line* no HPLC nos modos pré-coluna ou pós-coluna. A ninidrina tem sido um derivatizante amplamente utilizado na pós-coluna em sistemas de separação por troca iônica e detecção na faixa do visível (KLEIN, DUDENHAUSEN, 1995; MARSHALL; SHAFFER; CONKERTON, 1989; MOORE; PACKMAN; STEIN, 1958). Reagentes de derivatização pré-coluna, usando uma separação por cromatografia em fase reversa foram propostos, entre eles, são relevantes o cloreto de dansil (TAPUHI et al., 1981), o orto-ftaldeído (OPA) (GRATACÓS-CUBARSÍ et al., 2013; JONES; GILLIGAN, 1983), que não reagem com a prolina e cisteína; 9-cloroformato de fluorenilmetil (FMOC), com o problema de interferências do excesso de reagente ou subprodutos da reação (EINARSSON, 1985); isotiocianato de fenil (PITC) (COHEN; STRYDOM, 1988; REINA et al., 2014) cujos derivados podem coeluir; aminoquinolil-6-carbamato de N-hidroxisuccinimidil (AQC) (STRYDOM; COHEN, 1994), cujo produto de hidrólise interfere na determinação; além destes, as combinações de reagentes (OPA/FMOC, FMOC-CI/ADAM) também foram testadas (HEEMS et al., 1998; REINA et al., 2014; VÁSQUES-ORTIZ et al., 1995) a fim de resolver alguns dos problemas já mencionados. Contudo, a técnica de HPLC pode, para algumas matrizes complexas, apresentar perda significativa de seletividade e detectabilidade na determinação de aminoácidos. Nesse sentido, a cromatografia em fase gasosa pode apresentar algumas vantagens, pois apresenta um poder de resolução significativamente maior do que a HPLC dependendo do derivatizante utilizado na análise de aminoácidos (JIMÉNEZ-MARTÍN, 2012). Com o emprego da GC foi evidenciado a separação enantiomérica de vários aminoácidos (PIETROGRANDE; BASAGLIA, 2010; ZAHRADNÍČKOVÁ et al., 2007).

1.3.1 Derivatização em cromatografia em fase gasosa

A análise por cromatografia em fase gasosa requer características específicas dos analitos, que são, principalmente, volatilidade e estabilidade térmica compatível ao sistema. Os aminoácidos são substâncias constituídas por grupos funcionais fortemente polares, naturalmente não são voláteis, assim, para sua análise por GC é necessária uma etapa prévia de derivatização, que deve ser criteriosamente estudada para se obter, principalmente, recuperação aceitável dos analitos na etapa de validação.

A derivatização consiste na substituição dos hidrogênios livres ativos das funções químicas (funções polares) dos aminoácidos por grupamentos mais apolares que não apresentem a característica de formação de ligações de hidrogênio (SEGURA et al., 1998). Em decorrência disso, ocorrem modificações da estrutura química do analito e também do perfil de fragmentação do mesmo, possibilitando assim a análise por GC-FID e GC/MS. Portanto, a introdução de alguns elementos ou grupos por meio da derivatização química pode aumentar a resposta do detector ou gerar espectros de massa úteis para a elucidação das características estruturais dos analitos e sua detecção em matrizes complexas (SEGURA et al., 1998). Nesse sentido, a derivatização é uma reação química que modifica os compostos de interesse em outros, com o propósito de gerar produtos com propriedades cromatográficas adequadas, como a redução do ponto de ebulição ou de afinidade a uma coluna cromatográfica com fase estacionária específica (COLLINS et al., 2006). Para análises por GC, moléculas contendo grupos funcionais como $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $-\text{SH}$ são preocupantes em alguns casos devido à capacidade de formar pontes de hidrogênio ou ligações dipolo-dipolo entre as moléculas, acarretando em fraca volatilidade, insuficiente estabilidade térmica, ou ainda proporcionar interações demasiadas dos analitos com a fase estacionária e/ou *liner* (HALKET; ZAIKIN, 2003). Neste sentido, as reações de derivatização mais empregadas que podem ser utilizadas em análise por GC são alquilação, acilação e siliilação (SCHUMMER et al., 2009; GREENE; WUTS, 1993).

1.3.1.1 Alquilação

A alquilação é usada principalmente como o primeiro passo para outras derivatizações ou como um método de proteção de certos átomos de hidrogênio ativos em uma molécula da amostra. Ela representa a substituição de um hidrogênio ativo por um grupo alifático ou alifático-aromático, como o benzil, em um processo de esterificação (BIZKARGUENAGA et al., 2013).

A substituição de hidrogênio por um grupo alquil é importante porque o derivado tem baixa polaridade, em relação à substância-mãe. Os reagentes são utilizados para modificar compostos, tais como ácidos carboxílicos e fenóis. Os produtos resultantes são éteres, ésteres, tioéteres, tioésteres, n-alquilaminas, e n-alquilamidas. A alquilação de grupos fracamente ácidos (por exemplo, álcoois) requer catalisadores fortemente básicos (como metóxido de potássio ou sódio). Grupos mais ácidos (fenóis, ácidos carboxílicos) requerem catalisadores menos básicos como cloreto de hidrogênio e trifluoreto de boro (KNAPP, 1979)

1.3.1.2 Acilação

A acilação é outra técnica de derivatização utilizada, especialmente quando a GC/MS é aplicada. Ela consiste na introdução de um grupo acila na molécula, prendendo um átomo de hidrogênio reativo, ou seja, é a conversão de compostos que contêm hidrogênios ativos (-NH, -OH, -SH) em amidas, ésteres, tio ésteres ou da ação de um ácido carboxílico ou derivado carboxílico (SEGURA et al., 1998). Derivados acilados podem ser obtidos a partir de uma grande variedade de grupos funcionais: álcoois, aminas, amidas, tióis, fenóis, enóis, sulfonamidas, compostos insaturados e anéis aromáticos (KNAPP, 1979).

1.3.1.3 Sililação

A derivatização por sililação é a mais usada, pois é mais simples, rápida e versátil, além de ser compatível com a cromatografia em fase gasosa. Essas reações caracterizam-se por ocorrerem em etapa única e por apresentarem alto rendimento, mesmo em condições brandas. Ao realizar uma sililação, bloqueia-se os sítios próticos, havendo uma redução de interações do tipo dipolo-dipolo, tendo como benefício prático o aumento da volatilidade dos compostos, obtendo-se alta resolução e eficiência cromatográfica (BLAU; HALKET, 1993; HALKET; ZAIKIN, 2003).

A facilidade de derivatização de diferentes grupos funcionais dos aminoácidos com um agente sililante segue a ordem: ácido carboxílico > amina > amida. Dentro dessa sequência de reatividade, também pode haver influência de impedimentos estéricos da estrutura do composto. Desse modo, grupos primários reagem mais rapidamente que grupos secundários, os quais reagem mais rápido que grupos terciários (BLAU; HALKET, 1993; HALKET; ZAIKIN, 2003).

Em relação às condições analíticas, deve-se considerar que os reagentes sililantes e seus respectivos derivados são sensíveis ao efeito hidrolítico. Consequentemente, é necessário que as reações ocorram em frascos selados e com o derivatizante em excesso. Além disso, é importante que se opte por um solvente apropriado para a reação ocorrer, como a sililação ocorre em hidrogênios ativos, devem-se evitar solventes próticos e, em alguns casos, o próprio agente sililante pode ser empregado para esse propósito. Piridina, hexano, isoctano (ISOC), dimetilformamida, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano e acetonitrila (ACN) são os solventes comumente empregados. Geralmente, emprega-se aquecimento do sistema para favorecer uma derivatização efetiva (HALKET; ZAIKIN, 2003). Devido à diferença de reatividade de vários compostos polares, diversos agentes sililantes foram desenvolvidos para a sililação, com poder silil-doador distinto. Geralmente, para análises em GC, adicionam-se aos compostos polares grupos trimetilsilil (TMS) ou terc-butil(dimetil)silil (TBDMS). Nas análises em que o objetivo é a obtenção de derivados TMS, os agentes sililantes rotineiramente empregados são trimetilclorosilano (TMCS), N,O-bis(trimetilsilil) acetamida (BSA), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), N-trimetilsililimidazol (TMSIM),

hexametilsililazano (HMDS) e N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), além de misturas entre eles, com o intuito de catalisar as reações ou derivatizar moléculas complexas. Já quando o objetivo é obter derivados-TBDMS como produto, agentes derivatizantes como tert-butil(dimetil)clorosilano (TBDMCS), N-tert-butil(dimetil) sililimidazol (TBDMSIM) e N-tert-butil(dimetilsilil)-N-(metil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA) são empregados, ou a mistura deles, para reagirem com moléculas mais complexas (BLAU; HALKET, 1993).

Nas análises com a utilização de derivatizantes sililantes, quando se deseja obter derivativos-TMS, o MSTFA se destaca por ser mais volátil que o BSA e o BSTFA, ainda que possua poder silil-doador similar a ambos. TMCS e o imidazol podem ser utilizados como catalisadores, com o propósito de aumentar o poder de sililação do MSTFA (BLAU; HALKET, 1993).

A derivatização dos aminoácidos com o emprego do reagente derivatizante N-metil-N-(*tert*-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA) é vantajosa, já que permite a sililação simultânea de grupos amino e carboxila em uma única etapa e conseqüentemente reduz o tempo de preparo da amostra significativamente.

O mecanismo de reação da sililação é via substituição nucleofílica de segunda ordem (S_N2), onde o par de elétrons do heteroátomo mais eletronegativo, por exemplo, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, ataca o átomo de silício do grupo silil pela região de menor impedimento estérico, produzindo um estado de transição bimolecular (Figura 1). O grupo de saída (X) deve possuir baixa basicidade - habilidade de estabilizar uma carga negativa no estado de transição - e pouca ou nenhuma tendência para retro-ligação π (p-d) com o átomo de silício. Além disso, o grupo de saída ideal deve ser tal que rapidamente saia do estado de transição durante a reação, além de possuir estabilidade química suficiente para permitir o armazenamento do derivatizante em longo prazo para o uso quando necessário. Como a formação do estado de transição é reversível, a derivatização irá ocorrer completamente apenas se a basicidade do grupo de saída X for maior que a do grupo Y (BLAU; HALKET, 1993).

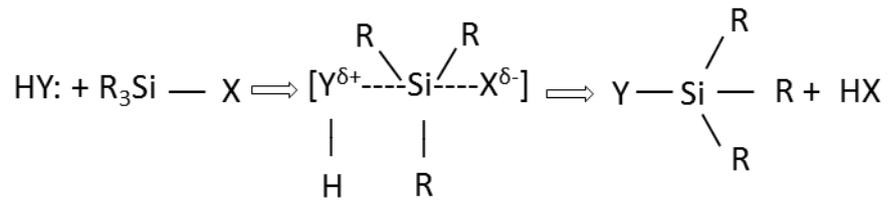


Figura 1 - Representação esquemático mecanismo geral da sililação.

A sililação por MTBSTFA em conjunto GC/MS e GC-FID pode ser um método alternativo para análise de traços de aminoácidos livres em produtos cárneos. Não obstante, a técnica baseada em GC/MS, pode ser considerada vantajosa devido ao fato de proporcionar uma melhor resolução cromatográfica, identificação precisa e inequívoca de aminoácidos em matrizes alimentícias, portanto, sendo uma técnica com alta sensibilidade e seletividade (JIMÉNEZ-MARTÍN, 2012). Devido à sua simplicidade e utilização limitada de reagentes químicos este método pode ser considerado adequado, além de ser eficiente na determinação de aminoácidos em concentrações diminutas nos alimentos com recuperações na faixa de 90-100% (RODIER et al., 2001).

Dessa forma as reações de derivatização citadas são utilizadas principalmente com o intuito de aumentar a volatilidade e a estabilidade térmica; melhorar as propriedades cromatográficas para análise por GC/MS e GC-FID; obter novas ou adicionais informações estruturais; estudar o mecanismo de dissociação iônica; aumentar a sensibilidade e seletividade de análises em nível traços; e determinação quantitativa por monitoramento de íon selecionado (SIM) (HALKET; ZAIKIN, 2003).

1.4 Validação de métodos cromatográficos

O bom desempenho de qualquer técnica analítica é influenciado pela qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Nesse sentido, é necessária a mensuração/avaliação de alguns parâmetros analíticos a fim de assegurar a

aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório, além de garantir que o mesmo gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra (RIBANI et al., 2004). Logo, o estabelecimento dos limites por meio da estimativa das figuras de mérito do método tais como seletividade, linearidade, precisão (intra e interdia), exatidão (recuperação), limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), que são avaliadas na etapa denominada validação (RIBEIRO et al., 2008), com o propósito de assegurar a qualidade dos resultados da determinação de qualquer analito.

1.4.1 Seletividade

A seletividade analítica de um método instrumental refere-se à medida em que o método pode ser utilizado para determinar precisamente analitos específicos em misturas, ou matrizes sem interferências de outros componentes (IUPAC, 2001) como impurezas, produtos de degradação, excipientes de comportamento similar.

Dessa forma, a seletividade é um importante parâmetro para a determinação inequívoca e exata de qualquer analito presente em matrizes complexas como os alimentos.

1.4.2 Curva analítica e linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (BRASIL, 2003). A correlação linear entre o sinal medido e a concentração da espécie é expressa graficamente por meio da chamada curva analítica, onde a abscissa representa a concentração do analito e a ordenada apresenta o sinal do detector. O cálculo da concentração dos analitos utiliza uma relação matemática, a qual pode ser obtida usando o modelo conhecido como regressão linear (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002) determinada pelo

método dos mínimos quadrados, de acordo com a equação da reta representada abaixo.

$$y = ax + b$$

onde:

y = resposta medida (altura ou área do pico, absorvância, etc.);

x = concentração do analito de interesse;

a = inclinação da curva de calibração – sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0.

A linearidade pode ser observada através do gráfico de dispersão dos pontos da curva e pelo coeficiente de correlação “R²”, produto da regressão linear das observações. Adicionalmente, a regressão fornece a equação matemática utilizada para prever resultados amostrais, onde se apresenta os termos da expressão linear e angular (a e b, respectivamente). O coeficiente de correlação permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados, sendo que valores acima de 0,99 e 0,90 são recomendados pela ANVISA (BRASIL, 2003) e pelo INMETRO (2003), respectivamente. Os analitos de interesse podem ser quantificados pelo método de padronização externa, padronização interna e superposição da matriz.

O método de padronização externa é realizado através da comparação da área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas por meio de soluções de concentrações conhecidas, em diversas concentrações, preparadas a partir de um padrão. A partir disso, obtém-se o cromatograma correspondente a cada uma delas e, em um gráfico, relacionam-se as áreas obtidas com as concentrações. Com o emprego deste gráfico ou a equação da curva resultante, a concentração desta substância na amostra pode ser calculada a partir da área da substância obtida no cromatograma resultante quando esta é injetada separadamente. O método de padronização interna consiste no preparo de soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, à qual é adicionada em uma quantidade conhecida na amostra e se denomina padrão interno (PI). Após análise dessas soluções, constrói-se um gráfico, relacionando a razão de

áreas dos picos cromatográficas (área da substância/área do padrão interno, que tem concentração constante) com a concentração (variada) da substância (INMETRO, 2003). Já o método de superposição de matriz define-se na adição do padrão da substância em diversas concentrações sem uma matriz similar à da amostra, isenta da substância, e construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. Entretanto, tem o inconveniente de não proporcionar a magnitude do efeito de co-extratos, além de aumentar o custo e o tempo das análises (EGEA-GONZÁLEZ et al., 2002).

1.4.3 Precisão

A precisão representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (INMETRO, 2003). A precisão é avaliada comumente pelo desvio padrão absoluto (s), intervalo de confiança da média de um número de medições ou pelo desvio padrão relativo (RSD), conhecido como coeficiente de variação (CV), conforme a seguinte expressão:

$$\text{RSD}(\%) = \text{CV}(\%) = (s/x_m) \times 100$$

Onde:

s : desvio padrão absoluto das medições em replicatas;

x_m : média das medições em replicatas

A precisão pode ser expressa como repetitividade, em que é observada a variação (CV) em replicatas da amostra analisadas no mesmo dia. Para métodos ao nível de traços, valores de RSD% até 20% são aceitáveis (HUBER, 1998).

1.4.4 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

Em um determinado procedimento experimental, LOD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, podendo ser calculada de várias maneiras: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (EURACHEM, 1998).

i) Método visual: o LOD é determinado através da comparação da adição de baixas concentrações conhecidas do analito, de tal modo que se possa determinar o menor nível em que o analito realmente pode ser detectado, distinguido-sedo ruído visualmente.

ii) Método da relação sinal/ruído: o LOD é determinado através da comparação entre a medição dos sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito na matriz e um branco da amostra. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal/ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção.

iii) Método baseado em parâmetros da curva analítica: o LOD é determinado através de parâmetros da curva analítica de acordo com a equação:

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

onde:

s= a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica

S= a inclinação ou coeficiente angular da equação da reta da curva analítica.

Já o LOQ representa a menor concentração que um analito pode ser quantificado. Os mesmos critérios de LOD podem ser adotados para o LOQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica (S), em níveis próximos ao LOQ, conforme EURACHEM (1998), a partir da equação:

$$LOQ= 10 \times \frac{s}{S}$$

onde:

s= a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica

S= a inclinação ou coeficiente angular da equação da reta da curva analítica.

1.5 Aplicações da análise de aminoácidos em produtos cárneos

Os produtos cárneos sofrem várias reações químicas importantes em decorrência do seu alto teor proteico e lipídico. Assim, em determinados produtos que passam por um período de maturação, como o salame, copa e presunto cru, algumas alterações bioquímicas ocorrem devido à atividade proteolítica exercida por enzimas endógenas e/ou microbianas e produzem peptídeos e aminoácidos livres (FLORES et al., 2009; LORENZO; BERMÚDEZ; FRANCO, 2013; ORDÓÑEZ et al., 1999); Um elevado grau de hidrólise proteica está diretamente relacionado ao aumento do sabor de maturado em produtos cárneos fermentados/maturados e defumados (MARTUSCELLI et al., 2009). Um dos principais aspectos dessa relação está no fato de aumentar a disponibilidade de aminoácidos livres, que são os principais precursores dos compostos voláteis importantes para o odor/aroma típicos desses produtos (JURADO et al., 2007; ORDÓÑEZ et al., 1999; PINNA et al., 2013).

Pinna et al. (2013) reportaram a influência do catabolismo de aminoácidos na formação do aroma característico durante o período de maturação em presunto Parma, e Jurado et al. (2007) em presunto Ibérico. Estes autores observaram o aumento das concentrações de compostos voláteis responsáveis pelo aroma, como aldeídos de cadeia ramificada, bem como tolueno e etilbenzeno, que foram positivamente correlacionados com a presença de aminoácidos livres. Além disso, Aro Aro (2010) observou que a adição de culturas *starters* (*Lactobacillus sakei* + *Staphylococcus carnosus* e *Pediococcus pentosaceus* + *Staphylococcus xylosus*) em salame estava relacionada com o aumento significativo de aminoácidos livres durante 21 dias de maturação, contribuindo para a formação do sabor e aroma devido à atividade proteolítica enzimática. Além de serem precursores de compostos

voláteis, a presença de aminoácidos é importante nutricionalmente, uma vez que Silva et al.(2013) encontraram concentrações desejáveis de aminoácidos essenciais (histidina, lisina, valina e leucina) em chouriço de cabra defumado. Dessa forma, produtos cárneos maturados e defumados podem ser considerados como uma fonte de proteína de alto valor biológico, fornecendo teores superiores desses nutrientes em relação ao valor diário recomendado à dieta humana (SILVA et al., 2013)

Cornet e Bousset (1999) demonstraram que o conteúdo de aminoácidos está estreitamente relacionado com o tipo metabólico das fibras e verificaram que músculos oxidativos apresentaram teor mais elevado de ácido aspártico, glutamina e taurina e maiores teores de β -alanina e carnosina foram encontrados nos músculos glicolíticos.

Sob aspecto toxicológico, alguns aminoácidos livres, como histidina, lisina, triptofano, entre outros, sofrem reações de descarboxilação enzimática e dessa forma são precursores de compostos denominados aminas biogênicas. A sua formação nos alimentos está condicionada à disponibilidade de aminoácidos livres, presença de microrganismos descarboxilase positivos e, também, às condições favoráveis para o crescimento bacteriano, síntese e ação de enzimas descarboxilases (SHALABY, 1996). Durante o processo de cura de produtos cárneos as proteinases podem exercer intensa atividade proteolítica do músculo, enquanto que na fermentação a desnaturação proteica favorece a proteólise como consequência da acidez, desidratação e ação do sal. Os fenômenos proteolíticos que ocorrem durante a maturação podem elevar a concentração dos aminoácidos precursores correlacionados com a formação das aminas biogênicas (VIDAL-CAROU et al., 2009).

A microflora utilizada como microrganismos *starters* pode fermentar embutidos secos espontaneamente com a capacidade de produzir quantidades significativas de putrescina e tiramina. As culturas iniciadoras, principalmente bactérias ácido lácticas, reduzem o tempo de fermentação, contudo este grupo de bactérias é associado com a produção de aminas (GLÓRIA, 2005). Em concentrações consideradas significativas em alimentos como pescado, produtos de pesca, carnes e alimentos fermentados (RABIE; PERES; MALCATA, 2014; SHALABY, 1996) essas aminas tornam-se compostos tóxicos, provocando efeitos indesejáveis ao organismo, podendo ser prejudiciais à saúde.

Pelo exposto, é notória a importância de se desenvolver métodos eficientes para a determinação do perfil de aminoácidos em alimentos, uma vez que esta informação pode ser utilizada nos diferentes aspectos nutricionais e sensoriais do desenvolvimento, maturação e armazenamento de produtos cárneos. A utilização da determinação por GC ainda que menos empregada que a HPLC apresenta-se como uma alternativa viável e promissora para a determinação desses compostos em produtos cárneos.

1.6 Ultrassom na indústria de alimentos

O ultrassom é uma onda mecânica acústica, logo necessita de um meio para se propagar. As ondas acústicas são classificadas levando em consideração a frequência audível pelo ouvido humano, que varia de 20 Hertz (Hz) a 20 kiloHertz (kHz), de maneira que frequências abaixo de 20 Hz são referidas como infrassom e acima de 20 kHz como ultrassom (CÁRCEL et al., 2012). Ondas ultrassônicas de alta energia são de baixa frequência (20-100 kHz) e desenvolvem níveis de potência mais altos ($10-1000 \text{ W cm}^{-2}$), com energia suficiente para romper enlaces intermoleculares, sendo que intensidades superiores a 10 W cm^{-2} originam efeitos de cavitação, capazes de modificar algumas propriedades físicas e favorecer reações químicas (PIYASENA et al., 2003; JAYASOORIYA et al., 2004).

O ultrassom pode ser aplicado em várias áreas na indústria de alimentos, podendo-se destacar os processos de cristalização, desgaseificação, secagem, extração, filtração, congelamento, homogeneização, esterilização e amaciamento de carne, além de descontaminação microbiológica de utensílios e produtos (DOLATOWSKI et al., 2007). Na elaboração de produtos cárneos é aplicado para reduzir o tempo de cozimento, melhorar a transferência de calor e a qualidade sensorial. No congelamento de carnes, o seu uso propicia uma queda rápida de temperatura, conseqüentemente favorece a formação de pequenos cristais e melhora a difusão (CHEMAT et al, 2011). Ademais, em produtos cárneos que utilizam salmoura, o ultrassom reduz o tempo necessário de cura, melhorando sua estabilidade e qualidade sensorial.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Determinação de aminoácidos livres por cromatografia em fase gasosa em salame tipo Italiano submetido a banho ultrassônico na massa inicial (anterior à fermentação), no produto fermentado/maturado (28 dias) e após 120 dias de vida útil.

2.2 Específicos

- Otimizar as condições cromatográficas para determinação de aminoácidos livres por cromatografia em fase gasosa, utilizando o detector de ionização em chama (GC-FID).

- Desenvolver e validar o método de derivatização de aminoácidos livres extraídos de produtos cárneos maturados.

- Avaliar o efeito de diferentes tempos de aplicação do ultrassom em relação aos aminoácidos livres presentes em diferentes pontos de fabricação e armazenamento do salame tipo Italiano.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho consistiram na otimização e validação de método para a determinação simultânea de aminoácidos livres em salame tipo Italiano e quantificação por GC-FID. Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Análise de Compostos Voláteis e Precursores em Alimentos e Laboratório de Tecnologias Limpas Aplicadas a Alimentos, ambos pertencentes ao Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA) da Universidade Federal de Santa Maria.

3.1 Reagentes, solventes e materiais utilizados

Os reagentes utilizados para as análises foram acetonitrila e diclorometano (estabilizado com 1% de amileno), ambos os reagentes grau cromatográfico e agente derivatizante N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA) todos adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos) e padrões analíticos sólidos dos L-aminoácidos (LAA21): Alanina, Glicina, Valina, Leucina Isoleucina, Norleucina (padrão interno), Prolina, Metionina, Serina, Treonina, Fenilalanina, Ácido Aspártico, Hidroxiprolina, Cisteína, Ácido glutâmico, Arginina, Asparagina, Lisina, Glutamina, Histidina, Tirosina, Triptofano e Cistina (FLuka); Ácido clorídrico 37% (Fmaia, Brasil); água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3® (resistividade de 18,2 MΩ cm); detergente alcalino para limpeza da vidraria, Extran® alcalino (Merck, Brasil); frascos de vidro (2 e 5 mL), com tampas de polipropileno com rosca e septo de silicone com face interna de PTFE (politetrafluoretileno), frascos de polipropileno do tipo Eppendorf (2 mL) e com tampa rosqueada com (50 mL); Inserts com capacidade de 200 µL, para frascos de 2,0 mL; gases: hélio e hidrogênio usado como gás de arraste, ar sintético usado como comburente e nitrogênio como gás *make-up* no sistema GC-FID. Todos os gases utilizados foram grau cromatográfico 5.0 (White Martins, Brasil); papel filtro analítico; sacos estéreis para homogeneizador de amostras tipo Stomacher.

3.2 Instrumentação analítica

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram Agitador do tipo Vórtex, modelo QL-901 (Colemam, Brasil); balança analítica de precisão Shimadzu, modelo AUY-220 (Japão); centrífugas modelos 5403 (Eppendorf, Alemanha) e himac CP-WX (Hitachi, Japão) equipadas com sistema de refrigeração; micropipetas monocanal com capacidade variável (Labmate, Brasil); processador de alimentos (Walita, Brasil); sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3® (Millipore, Bedford, MA, USA); blocos de aquecimento Concentrator e Dry (Technal, Brasil), Banhos de ultrassom USC 1600 da (Unique, Brasil) com frequência de 40 kHz e potência de 135 W; Homogeneizador de amostras tipo Stomacher, modelo MK1204 (Boitton, Brasil); Bomba hidrovácuo, modelo Q355J (Quimis, Brasil).

3.3 Amostras

As amostras de salame foram produzidas no Laboratório de Carnes e derivados do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria e os tratamentos de aplicação da radiação de ultrassom em banho no Laboratório de Tecnologias Limpas Aplicada a Alimentos.

3.3.1 Produção dos salames tipo Italiano

Os salames tipo Italiano foram preparados conforme formulação proposta por Cichoski et al. (2009) a partir da mistura de 60% carne suína (pernil) moída em disco de 10 mm, 30% carne bovina (paleta) moída em disco de 5 mm e 10% de gordura retirada da paleta suína e moída em disco 10 mm. Foi também adicionado

0,3% de cura para salames, 0,25% de eritorbato de sódio, 1% de condimento para salame tipo Italiano, todos fornecidos pela Kraki Kienast & Kratschmer Ltda (Santo André, SP), 1% de sacarose (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ), 1% de sal de cozinha e cultura para salame (Lyocarni VBM-60, Sacco Brasil, Campinas, SP; composta de *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus*, *Pediococcus pentosaceus* e *Pediococcus acidilactici*) previamente ativada conforme proposto por (TERRA; FRIES;TERRA, 2001) e adicionada conforme recomendações do fabricante (20 g cultura para cada 100 kg massa). Todos os ingredientes foram adicionados em misturadeira (modelo MJ1 35, Jamar LTDA, Tupã, SP) e misturados por 15 minutos. A massa foi então embutida (embutideira modelo PJI-09, Jamar LTDA, Tupã, SP) em tripas sintéticas com diâmetro de 60 mm (Kraki Kienast & Kratschmer Ltda, Santo André, SP) previamente tratadas com solução de ácido acético a 5% por 30 minutos. Os salames mediram de 15 a 18 cm de comprimento e tiveram peso médio entre 380 e 450 gramas. Após o embutimento, os salames foram empacotados em embalagens plásticas de polietileno (embaladora modelo 200B, Selovac, São Paulo, SP). Esta embalagem foi adotada em virtude de os salames desembalados absorverem água quando expostos ao US, conforme observado em testes prévios.

3.3.2 Sonicação

Os salames foram selecionados aleatoriamente para compor os quatro lotes de tratamentos. Para sonicação foi usado banho 25 kHz no modo normal (Elma® TI-H 5, Singen, Alemanha; 500 W, 1,8 W/cm²) com metade do volume máximo de água (cerca de 2,4 litros), sendo a água renovada após cada sonicação e ajustada para 20±1 °C. A cada batelada, a temperatura inicial e final da água foi registrada, sendo observado aumento máximo de 3°C (tempo de exposição 9 min). Cada lote foi submetido ao US por 0 (controle), 3, 6 ou 9 minutos, compondo os quatro tratamentos deste experimento. Foram sonicados quatro salames por batelada, sendo dispostos dois salames embaixo e dois em cima. Na metade do tempo de cada tratamento, os salames foram invertidos (os de baixo colocados em cima e virados de lado) para que a sonicação ocorresse de forma mais homogênea possível

em todas as amostras. Para evitar que os salames flutuassem, foi necessário cobrir os salames com um peso de 800 g feito de chumbadas de pesca empacotadas a vácuo

Após a sonicação, os salames foram retirados da embalagem plástica e pesados para acompanhamento da perda de peso por desidratação na câmara.

3.3.3 Fermentação e maturação dos salames

Os salames foram dispostos aleatoriamente na câmara de fermentação / maturação (Menoncin Ind. Com. LTDA, Erechim, RS), onde permaneceram por 28 dias. A programação de umidade relativa (UR) e temperatura seguiu proposta de Cichoski et al. (2009), sendo a seguinte: 1º dia: 95%UR (umidade relativa) e 25 °C; 2º dia: 92% UR e 24 °C; 3º dia 89% UR e 23 °C; 4º dia: 86% UR e 22 °C; 5º dia: 83% UR e 21 °C; 6º dia: 80% UR e 20 °C; 7º dia: 80% UR e 19 °C; 8º ao 28º dia: 75% UR e 18 °C. Em função da umidade e a temperatura não serem totalmente homogêneas no interior da câmara, na metade do tempo (14 dias), os salames foram redistribuídos. O fim da etapa de processamento e a retirada dos salames da câmara foi determinada pelo valor de atividade de água dos mesmos, seguindo recomendação da legislação brasileira, a qual preconiza que salames tipo Italiano devem apresentar atividade de água máxima de 0,90 para serem considerados seguros para consumo (BRASIL, 2000).

3.3.4 Armazenamento

Os salames foram analisados de acordo com o período de processamento (massa inicial de salame, equivalente ao tempo inicial, e 28 dias na câmara) e ao longo da vida de prateleira (após 120 dias de armazenamento), considerando que salames comerciais geralmente possuem validade de quatro meses. Para avaliação na vida de prateleira, os salames foram retirados da tripa e empacotados a vácuo

em embalagem plástica de polietileno de baixa densidade e nylon de 30 μm e barreira ao oxigênio menor que 30 (embaladora modelo 200B, Selovac, São Paulo, SP). Buscando simular condições comerciais, os salames foram expostos à temperatura ambiente (20 – 25°C) sem abrigo da luz.

3.4 Preparo das Soluções

As soluções padrão a partir de cada aminoácido (L-alanina, L-glicina, L-Valina, L-leucina L-isoleucina, DL-norleucina (padrão interno), L-prolina, L-metionina, L-serina, L-treonina, L-fenilalanina, L-ácido aspártico, L-hidroxiprolina, L-cisteína, L-ácido glutâmico, L-arginina, L-asparagina, L-lisina, L-glutamina, L-histidina, L-tirosina, L-triptofano e L-cistina) foram preparadas. Para isso, 20mg de cada AA foi dissolvido em solução de HCl 0,1mol L⁻¹ em um balão de 5 mL com utilização de um banho ultrassônico, resultando numa solução de concentração de 4 g L⁻¹(solução estoque).

3.5 Preparo das amostras

50 g de cada amostra foram coletados de diferentes partes das peças de salame. Essas amostras foram trituradas em um processador de alimentos em temperatura ambiente e armazenado em freezer à -23 °C até o momento das análises (24 h aproximadamente). Todas os tratamentos foram analisados em triplicata.

3.6 Extração dos aminoácidos livres

A extração dos aminoácidos livres seguiu o método descrito por Aristoy e Toldrá (1991), onde cinco gramas de cada amostra triturados foram pesados diretamente em sacos plásticos de homogeneização. As amostras foram acrescentadas de 25 mL de solução de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e homogeneizadas durante 4 minutos em homogeneizador de amostras tipo Stomacher. A amostra foi então transferida para um tubo de plástico de fundo cônico de 50 mL e centrifugado a 10000 rpm durante 50 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Os sobrenadantes foram filtrados com papel filtro e armazenados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ em tubo de polipropileno de 2 mL até à análise.

3.7 Desproteínização e derivatização dos aminoácidos livres

Soluções padrão e amostras dos produtos cárneos foram analisadas seguindo o mesmo procedimento. Cem microlitros do filtrado homogeneizado de cada amostra de salameou solução contendo os padrões foram colocados em tubos do tipo eppendorf. Em seguida, 250 μL de acetonitrila foram adicionados para desproteínizar as amostras e foram agitados vigorosamente em agitador do tipo vórtex. Os tubos foram, então, centrifugados a 10000 rpm durante 3 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, 100 μL de sobrenadante foram transferidos para frascos de 5 mL e adicionados de 100 μL de uma solução de DL-norleucina na concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ como padrão interno. A mistura foi submetida ao processo de secagem a vácuo (Hidrovácuo -720 mm Hg em banho seco a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 50 minutos). A água residual foi removida pela adição de 50 μL de diclorometano nas amostras secas que novamente foram submetidas à secagem pelo mesmo procedimento durante 15 minutos. Finalmente, 50 μL do agente derivatizante (MTBSTFA) e 50 μL de acetonitrila foram adicionados aos frascos secos e fechados com tampa de rosca de face interna PTFE, os quais foram levemente agitados manualmente e subsequentemente incubados a 100°C durante 120 minutos para induzir a reação de

derivatização. Então os tubos foram estocados a -18 °C e as amostras analisadas em GC-FID.

3.8 Análises Cromatográficas

A análise quantitativa foi realizada em cromatógrafo a gás Varian Star CX 3400 (Varian Inc, EUA) equipado com detector de ionização em chama (GC-FID) e amostrador automático (Varian 8100). A amostra derivatizada (1µL) foi introduzida no injetor do tipo *split/splitless*, operando no modo *splitless*, e após 1 minuto foi programada a abertura da válvula de split na razão 30:1. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com pressão constante de 15 psi. A separação dos analitos foi realizada em uma coluna capilar de fase apolar, Rtx-5MS- 5% difenil/ 95% dimetil polisiloxano (30m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme – Restek-USA). A programação de temperatura da coluna iniciou a 100 °C por 2 min, seguida de um aumento para 185 °C a 6 °C/min, onde permaneceu por 1min. Após a temperatura aumentou a 1°C/min até 200 °C e por fim até 320 °C a 15 °C/min, mantendo em isoterma por mais 5 min. O tempo total da corrida foi de 45,16 min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 320 °C. O sistema de aquisição de dados foi obtido através do Software T2100P chromatography Station Plus Edition Version 9.04-28 (Techcomp, China). A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa, comparando-se as áreas obtidas de soluções de concentrações conhecidas do padrão contendo a mistura dos aminoácidos com as áreas obtidas das amostras por meio de uma curva.

3.9 Otimização das condições cromatográficas para determinação de aminoácidos

Os parâmetros temperatura do injetor, pressão e rampa de temperatura do forno do GC foram otimizados em relação ao ganho de sinal analítico e seletividade dos analitos. Dessa forma, o injetor do GC foi avaliado nas temperaturas em 280 e

320 °C. As pressões de gás de arraste hidrogênio testadas foram 13, 15 e 20 psi. As condições de programação de temperatura da coluna foram testadas de modo a obter maior resolução para analitos que apresentavam grau de coeluição e diferentes combinações de rampa de temperatura e períodos de isoterma foram testados.

3.10 Otimização do procedimento de derivatização

3.10.1 Tempo e temperatura

O tempo e a temperatura de derivatização foram avaliados com as soluções contendo a mistura de 22 padrões de aminoácidos, todos na concentração de 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com o intuito de se obter o maior sinal analítico do sistema cromatográfico. Um delineamento composto central 2^2 com 5 repetições no ponto central e pontos axiais ($\pm\sqrt{2}$) foi empregado neste estudo (Tabela 2). Os intervalos de tempo e temperatura objetos de estudo variaram de 80 a 120°C e de 77,7 a 162,3 minutos, respectivamente. Os dados foram analisados por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM).

Tabela 2 - Delineamento Composto Central 2^2

Variável	$-\sqrt{2}$	-1	0	1	$\sqrt{2}$
X1(T °C)	80	85,82	100	114,18	120
X2 T (min)	77,7	90	120	150	162,3

Após a realização do delineamento experimental, as amostras foram também avaliadas testando univariadamente o tempo e temperatura de derivatização. Com relação aos tempos foram testados 1, 2 e 3h de derivatização a 100 °C. Os ensaios univariados foram realizados em quadruplicata. Foi realizada a análise estatística

por meio de ANOVA e feita a comparação entre médias pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$) para cada um dos aminoácidos.

3.10.2 Ensaio com Piridina

Além da acetonitrila, a piridina também foi testada como solvente a ser empregado na etapa de derivatização dos aminoácidos. Foi utilizada piridina juntamente com o agente derivatizante MTBSTFA com diferentes relações de volumes (1:1; 1:1,5; 1:3), respectivamente, seguindo a metodologia proposta por Oms-Oliu (2011), e com volumes de piridina e ACN (1:1 v/v) e MTBSTFA, seguindo o mesmo procedimento de derivatização realizado por Jiménez-Martín (2012), a fim de avaliar a resposta do sinal cromatográfico para os derivados de aminoácidos obtido no GC-FID.

3.11 Validação do método

Após a etapa de otimização do método cromatográfico e de preparo da amostra, o método para determinação de aminoácidos livres foi validado considerando os seguintes parâmetros de mérito: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, LOD e LOQ, utilizando os derivados TBDMS voláteis dos aminoácidos livres obtidos das amostras e padrões autênticos.

3.11.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela injeção de uma solução aquosa ácida de concentração conhecida contendo uma mistura dos 22 L-aminoácidos de interesse. Em seguida foram injetadas no sistema cromatográfico soluções do

branco e de cada aminoácido individualmente para confirmar sua identidade através da sobreposição dos picos individuais em relação à solução injetada com a mistura.

3.11.2 Linearidade

O estudo da linearidade foi feito a partir do preparo da solução-estoque de 4 g L⁻¹. A partir dessa solução, diluições com sete níveis de concentrações diferentes foram feitas (160, 80, 40, 20, 10, 5, 1 µg mL⁻¹). Três repetições de cada nível de concentração foram derivatizadas e analisadas para construir a curva de calibração. As equações da curva de calibração e seus coeficientes de correlação correspondentes foram obtidos para cada aminoácido. O padrão interno norleucina foi adicionado para controle das derivatizações na concentração de 25 µg mL⁻¹. Para os cálculos da curva foi considerada a área do pico de cada aminoácido.

3.11.3 Precisão Intra-dia

A precisão do método foi avaliada em função da repetitividade (intra-dia) e da precisão estimadas de acordo com as recomendações da ANVISA (2003). Para tanto, foram injetadas seis repetições de soluções com dois níveis de concentração (40 e 80 µg mL⁻¹) no mesmo dia e avaliados os valores de RSD. O padrão interno norleucina foi adicionado para controle das derivatizações na concentração de 25 µg mL⁻¹.

3.11.4 LOD e LOQ

LOD e LOQ dos analitos das soluções foram determinados pelo método da relação sinal/ruído. A relação sinal/ruído utilizada foi de 3:1 e 10:1 para LOD e LOQ, respectivamente.

3.12 Análise estatística

Os salames oriundos de três períodos (0, 28 e 120 dias), sendo que cada período foi submetido a quatro tratamentos (0, 3, 6 e 9 min de sonicação) foram avaliados em triplicata, totalizando 36 unidades experimentais. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), suas médias ajustadas pelos quadrados mínimos e comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância. Quando necessário foi aplicado o Teste t ao nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas no aplicativo STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc, Tulsa – OK, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do sistema cromatográfico

4.1.1 Temperatura do injetor

Algumas alterações feitas no equipamento podem contribuir para a obtenção de melhores resultados. Nesse sentido, o aumento da eficiência foi obtido com a elevação da temperatura do injetor de 280 °C para 320°C. Assim, foi possível verificar um incremento nas áreas de todos os aminoácidos de 5% (Arg) a 30% (Gly), conforme a Tabela 3. Desse modo, a utilização do injetor a 320°C favoreceu a análise de aminoácidos encontrados em menores concentrações nas amostras. Além disso, obteve-se redução expressiva nos coeficientes de variação de 21 aminoácidos, sendo de 1,70% (Pro) a 13,50% (Arg), com exceção da Val (Tabela 3). Esses resultados nos permitem afirmar que a elevação da temperatura do injetor proporcionou uma maior eficiência na transferência de massa dos analitos para o interior da coluna, com o ganho de sinal analítico e maior precisão.

Tabela 3 – Áreas dos analitos em diferentes temperaturas do injetor do GC.

Aminoácido	Área média		RSD Área (%)	
	280 °C	320 °C	280 °C	320 °C
Alanina	295442	352533	4,59	2,73
Glicina	379305	494633	5,28	2,42
Valina	249005	309863	4,66	6,37
Leucina	227548	266477	5,16	2,45
Isoleucina	260366	293286	6,33	2,21
Norleucina	274695	306690	5,85	3,06
Prolina	89615	105271	6,38	4,68
Metionina	213415	236965	8,53	2,77
Serina	341556	379014	9,07	2,31
Treonina	175037	191465	10,68	1,77
Fenilalanina	235741	270419	8,49	2,26
Asparagina	283478	316541	10,06	2,21
Hidroxiprolina	76171	89581	13,06	3,18
Cisteína	7623	8658	10,06	2,66
Ác. glutâmico	262465	287914	10,84	2,61
Arginina	40502	42429	16,52	3,02
Asparagina	172641	190481	12,04	3,23
Lisina	77523	85187	15,62	4,45
Glutamina	38978	42601	13,29	5,41
Histidina	54851	66999	27,83	15,16
Tirosina	136645	158487	12,95	7,37
Triptofano	98219	118571	16,64	11,80
Cistina	30308	35158	36,47	33,85

4.1.2 Desempenho cromatográfico

Os aminoácidos derivados Arg e Glu mostraram uma separação insuficiente, com baixa resolução no sistema GC/FID. Em outros estudos realizados com GC/MS esta coeluição não ocorre devido a seletividade proporcionada pelo detector de massas utilizado no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM, *Selected Ion Monitoring*) (JIMÉNEZ-MARTÍN et al., 2012; BARA et. al., 2010). Em vista disto, foram testadas diferentes pressões na cabeça da coluna e programações lineares de aumento de temperatura no forno da coluna. As pressões no injetor testadas foram 13, 15 e 20 psi, sendo que a melhor eficiência e resolução foram observadas na pressão mantida em 15 psi, melhorando principalmente a separação dos picos da Glu e Arg. Ao mesmo tempo, as condições de aumento da temperatura perto do

ponto de ebulição da Glu e Arg foram modificadas, reduzindo a taxa de aumento da temperatura de 4 para 1 °C min⁻¹, no intervalo de temperatura de 185 a 200 °C, favorecendo a separação dos analitos e com melhor resolução para a Glu e Arg, tanto para a solução com padrões quanto para amostras de salame (Figuras 2 e 3).

4.2 Otimização do procedimento de derivatização

4.2.1 Tempo e temperatura

A análise estatística de RSM mostrou que os modelos não foram significativos e apresentaram falta de ajuste para as variáveis estudadas. Apesar de não significativo os resultados indicaram a necessidade de aumentar tempo e temperatura de derivatização em relação ao ponto de menor tempo e temperatura para se obter ganho de sinal analítico. A falta de ajuste dos modelos e não significância na análise dos aminoácidos se atribuiu a decorrência das altas temperaturas aplicadas no experimento, sendo estas bem acima do ponto de ebulição do solvente utilizado (acetonitrila, ponto de ebulição: 82 °C). Percebeu-se que temperaturas superiores a 105 °C no procedimento de derivatização favoreceram o vazamento do solvente e derivatizante utilizados para a amostra e, assim concentrando e aumentando o sinal de forma indevida. Ademais, temperaturas acima de 100 °C propiciou possíveis reações de degradação dos aminoácidos, uma vez que as soluções contendo os analitos deixaram de ser incolor e passaram a ter tons de coloração marrom, que aumentaram de intensidade com o aumento da temperatura.

A temperatura de 100 °C foi escolhida para realizar a derivatização devido ao exposto acima. O experimento univariado nessa temperatura que envolveu três diferentes tempos (1, 2 e 3 h) de derivatização (item 3.10.1) mostrou que as áreas dos picos cromatográficos não diferiram significativamente ($p < 0,05$) para 20 dos 22 aminoácidos analisados (Tabela 4). Os aminoácidos Thr e Arg diferiram entre os tempos de 1 e 3 h e 1 e 2 h, respectivamente, optando-se dessa forma por utilizar 2 h em bloco de aquecimento para a etapa de derivatização.

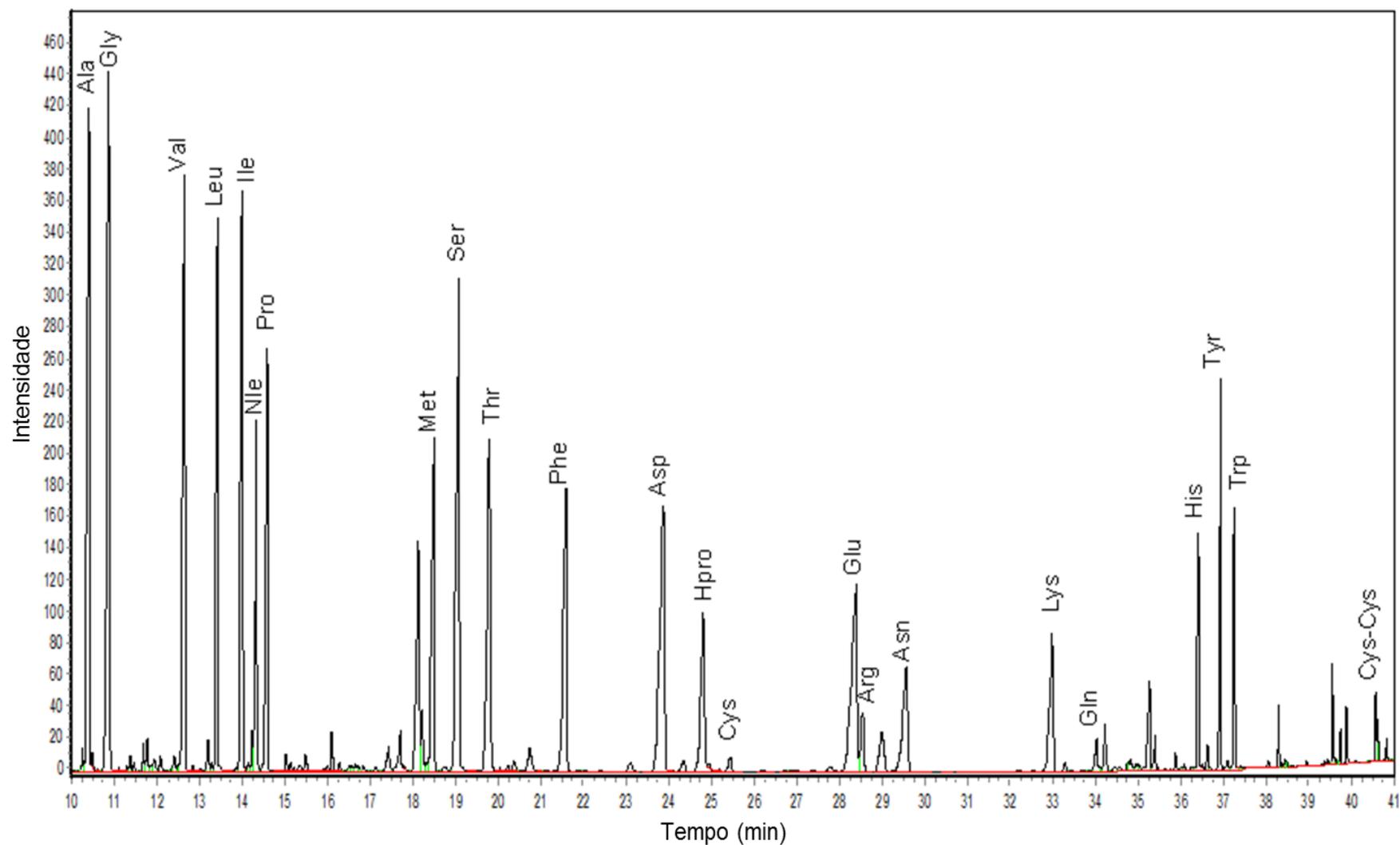


Figura 2 – Separação cromatográfica em GC-FID da mistura de padrões ($160 \mu\text{g mL}^{-1}$) contendo os 22 aminoácidos estudados.

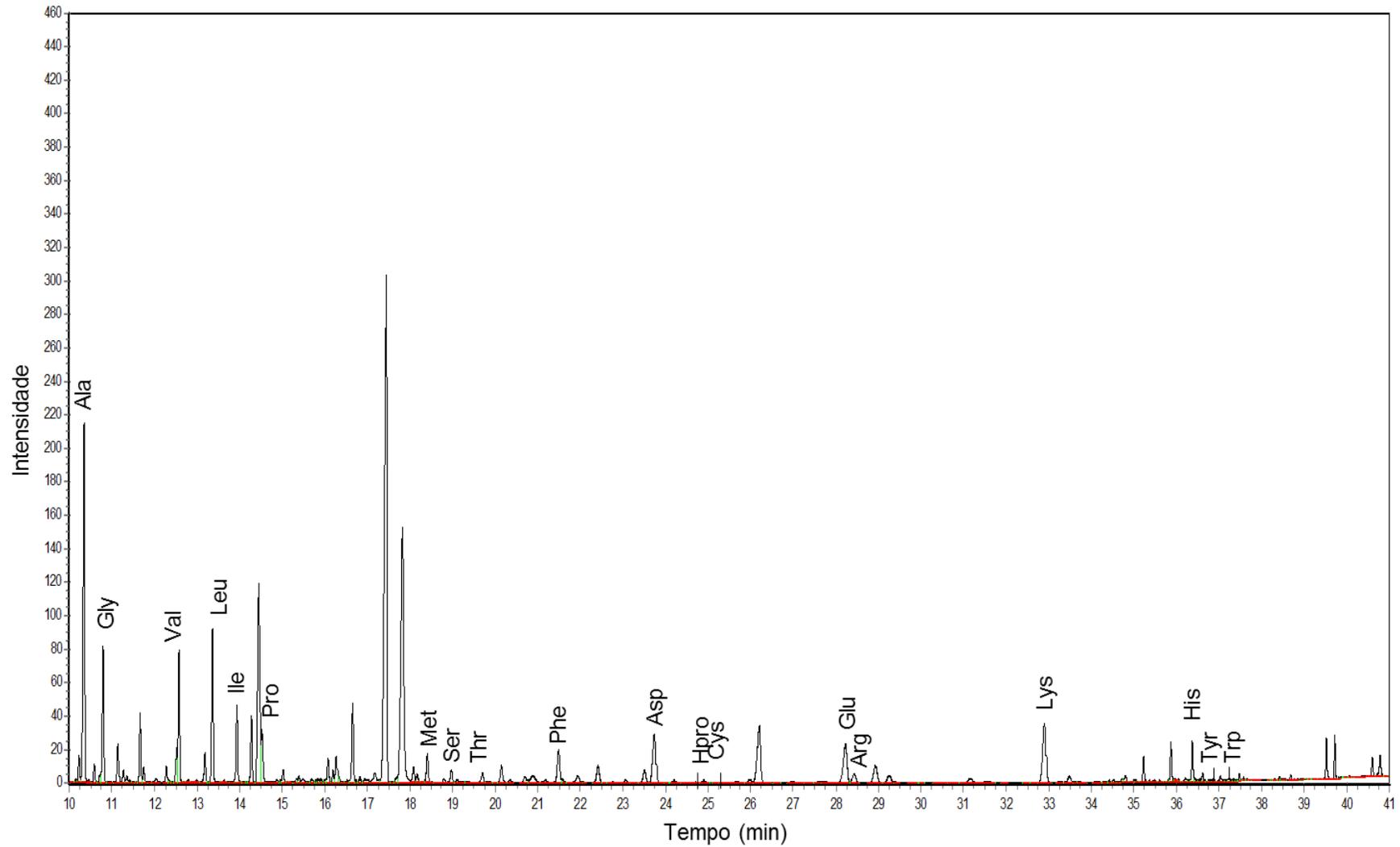


Figura 3 - Separação cromatográfica em GC-FID de aminoácidos livres em salame fermentado/maturado (28 dias).

Tabela 4 – Áreas médias dos aminoácidos derivatizados por 1, 2 e 3 h a 100 °C

Aminoácido	Área arbitrária média		
	1h	2h	3h
Alanina	571054*	677191	664039
Glicina	700517	838598	869379
Valina	483036	585093	562332
Leucina	431135	502065	486977
Isoleucina	435309	507788	497381
Norleucina	391991	400559	322572
Prolina	253464	179069	209917
Metionina	321525	415043	389128
Serina	517654	655691	644871
Treonina	164172 ^b	332907 ^{ab}	361817 ^a
Fenilalanina	315028	427346	413465
Asparagina	336923	429551	414553
Hidroxiprolina	90101	153867	207560
Cisteína	9569	29013	47261
Ác. glutâmico	270959	367264	352034
Arginina	28162 ^b	67560 ^a	78105 ^a
Asparagina	121090	125610	123139
Lisina	108900	133085	124724
Glutamina	23313	24061	25947
Histidina	50311	66625	63738
Tirosina	103248	132027	128632
Triptofano	68976	94379	95185
Cistina	81408	55441	52205

*n = 3

Na avaliação das soluções dos aminoácidos submetidos a 3h de derivatização observou-se a ocorrência de alteração de cor da solução contendo a mistura dos aminoácidos após o procedimento. Essas características demonstram que houve reações químicas, possivelmente, em decorrência do longo período de aquecimento.

4.2.2 Ensaio com Piridina

Os experimentos com utilização do solvente piridina como meio da reação demonstraram que quando foi utilizada a proporção piridina-MTBSTFA na proporção

1:1, seguindo o método de Oms-Oliu (2011) maiores áreas foram obtidas para 18 derivados t-BDMS comparando-se com a derivatização utilizando ACN como solvente, com exceção da Thr, Hpro e Trp. Por outro lado, usando o método com piridina não foi detectado os derivados t-BDMS para a Arg. A ausência desse aminoácido pode ter sido ocorrida devido à temperatura de 40 °C empregada no procedimento (Apêndice A). Como visto acima é necessário utilizar temperaturas mais elevadas no meio de derivatização como 135 °C (GEHRKE; NAKAMOTO; ZUMWALT, 1969) e 150 °C (GEHRKE; LEIMER, 1970) e por maiores tempos no processo de derivatização quando se utilizam agentes sililantes para a determinação da Arg (DROZD, 1981).

Apesar da temperatura não favorecer a reação de derivatização de alguns aminoácidos em meio piridínico, notou-se que para muitos analitos este solvente apresentou propriedades catalíticas (BLAU; HALKET, 1993). A piridina, ao mesmo tempo que favoreceu, também impediu o ataque nucleofílico, reduzindo assim o poder silil doador para os três primeiros aminoácidos citados e impediu a reação do aminoácido com cadeia lateral carregada negativamente. Entretanto, ao utilizar-se a derivatização de acordo com Jiménez-Martín (2012) (com o tempo de 2 h e temperatura de 100 °C), empregando piridina como solvente, obtiveram-se respostas menores no sinal para todos os aminoácidos em comparação com o original que utiliza ACN. Desse modo, optou-se pelo emprego da ACN como solvente, pois neste ensaio foi possível detectar e quantificar todos os aminoácidos de interesse no presente estudo.

4.3 Validação do método

4.3.1 Seletividade

A análise por GC-FID dos derivados de aminoácidos apresentou adequada seletividade, como pode ser observado na Figura 2. A grande maioria dos analitos teve boa resolução, com ausência de interferentes nos tempos de retenção na

solução de padrões de aminoácidos e também nas amostras. Os picos da Arg, Glu e Cys-Cys apresentaram um pequeno grau de coeluição desta forma não foi possível obter a separação total destes analitos e um cuidado especial foi tomado na integração dos picos cromatográficos. Glu e Arg não foram detectados por Biermann et al. (1986), quando analisou aminoácidos com o MTBSTFA e GC-FID, utilizando uma coluna capilar de vidro de fase ligada de silicone de diâmetro maior SBP-5 (60 m x 0,75 mm x 1,0 µm). Mais tarde, Wang et al. (1994) não conseguiram detectar Arg utilizando cloroformato de isobutila como agente derivatizante com o mesmo detector. No presente trabalho, ao utilizarmos uma coluna capilar de sílica fundida conseguiu-se realizar a separação desses derivados, logo podemos demonstrar que ao empregarmos colunas capilares de diâmetro menor e material de fase estacionária adequados é possível garantir uma separação eficiente dos analitos de interesse.

4.3.2 Linearidade

Através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas, e análise das equações das retas obtidas no GC-FID foi possível visualizar que os modelos de regressão linear foram adequados para as determinações analíticas neste estudo.

Foi possível obter coeficientes de correlação maiores que 0,99 para 21 dos 22 aminoácidos analisados, sendo que somente a glicina apresentou valor inferior (0,9869). Biermann et al. (1986) ao utilizar GC-FID, e Gökmen; Serpen; Mogol (2012), ao empregarem cromatografia líquida por interação hidrofílica (HILIC) e detecção por espectrômetro de massas, conseguiram obter R^2 maiores que 0,99 para todos os mesmos aminoácidos analisados no presente trabalho. Jiménez-Martín et al. (2012) obtiveram valores de R^2 maiores que 0,99 com exceção de Tyr para a curva de calibração empregada para determinar o teor de aminoácidos livres de diferentes matrizes cárneas. Em nosso estudo, quatorze aminoácidos analisados apresentaram faixa linear entre 1,0 e 160,0 µg mL⁻¹, e os demais aminoácidos variaram entre 5 a 20 e 160 µg mL⁻¹. Os valores de LOD e LOQ variaram entre 0,3 e 10 µg mL⁻¹ e 1 e 20 µg mL⁻¹, respectivamente (Tabela 5). Kaspar et al. (2008) reportaram menores limites de detecção e quantificação (0,03 - 12 µM e 0,3 - 30 µM,

respectivamente) na análise de fluidos biológicos e Jiménez-Martín et al. (2012) encontraram na faixa de 0,01 a 0,46 mg 100 g⁻¹ (LOD) e de 0,02 a 1,55 mg 100 g⁻¹ (LOQ) em produtos cárneos e derivados, ao empregaram a técnica de GC/MS. Porém, os resultados obtidos no presente trabalho permitem realizar as determinações dos aminoácidos estudados nas faixas de concentração validadas.

Tabela 5 – Tempo de retenção (Tr), equação da regressão linear e coeficientes de determinação das curvas analíticas dos aminoácidos analisados por GC-FID

Aminoácido	Tr	Eq. Calibração	R ²	Faixa Linear (µg mL ⁻¹)	LOD	LOQ
Ala	10,35	y = 5134x - 2504	0,9987	1 - 160	0,3	1
Gly	10,83	y = 5730x + 19661	0,9869	10 - 160	5	10
Val	11,96	y = 4768x - 10108	0,9974	1 - 160	0,3	1
Leu	13,38	y = 3926x - 4038	0,9983	1 - 160	0,3	1
Ile	13,96	y = 4118x + 6113	0,9984	1 - 160	0,3	1
Pro	14,55	y = 3182x - 17043	0,9990	5 - 160	1	5
Met	18,44	y = 3423x - 4809	0,9990	1 - 160	0,3	1
Ser	19,01	y = 5883x - 27263	0,9963	1 - 160	0,3	1
Thr	19,74	y = 3974x - 25267	0,9955	5 - 160	1	5
Phe	21,53	y = 3777x - 1286	0,9971	1 - 160	0,3	1
Asp	22,61	y = 4795x - 30485	0,9933	1 - 160	0,3	1
Hpro	21,05	y = 2709x - 14899	0,9995	5 - 160	1	5
Cys	19,08	y = 169x + 1436	0,9992	20 - 160	10	20
Glu	28,27	y = 4117x - 14273	0,9982	1 - 160	0,3	1
Arg	27,07	y = 749x - 1820	0,9994	1 - 160	0,3	1
Asn	26,55	y = 2028x - 8398	0,9943	1 - 160	0,3	1
Lys	29,65	y = 2211x - 14191	0,9947	1 - 160	0,3	1
Gln	29,03	y = 473x - 1451,9	0,9933	5 - 160	1	5
His	34,58	y = 1502x - 8909	0,9981	10 - 160	5	10
Tyr	36,92	y = 2392x + 249	0,9938	1 - 160	0,3	1
Trp	37,24	y = 1629x - 5116	0,9976	1 - 160	0,3	1
Cys-Cys	40,55	y = 552x - 7151	0,9972	20 - 160	10	20

4.3.3 Precisão

Os valores para o estudo da repetitividade (RSD) dos aminoácidos em solução aquosa ácida ficaram abaixo de 15% para a maioria dos compostos avaliados (Tabela 6). Nossos estudos estão de acordo com Jiménez-Martín et al.

(2012), os quais reportaram RSD inferior a 15% para 15 dos 22 aminoácidos analisados intra-dia. Em análise por GC-FID, foram obtidos RSD inferiores a 10% para 19 aminoácidos livres presentes em mel com o emprego da técnica de extração líquido-líquido e derivatização com cloroformato de alquila (NOZAL et al., 2004). Para matrizes complexas, como os alimentos, a precisão é dependente da matriz da amostra, da concentração do analito e da técnica de análise, podendo variar entre 2% e mais de 20% (RIBANI et al., 2004).

Tabela 6 – Ensaio de precisão para os 22 derivados de aminoácidos (n=6)

Nº	Aminoácido	RSD Intra-dia (%)	
		40 µg mL ⁻¹	80 µg mL ⁻¹
1	Alanina	9,26	5,34
2	Glicina	6,26	3,52
3	Valina	27,07	13,40
4	Leucina	8,87	7,45
5	Isoleucina	9,40	8,23
6	Prolina	27,22	20,46
7	Metionina	10,07	7,93
8	Serina	12,33	6,47
9	Treonina	14,07	9,26
10	Fenilalanina	13,13	6,97
11	Ác. aspártico	11,89	7,03
12	Hidroxiprolina	28,34	4,77
13	Cisteína	17,18	26,42
14	Ác. glutâmico	9,16	7,47
15	Arginina	20,17	4,73
16	Asparagina	22,23	12,50
17	Lisina	16,72	4,57
18	Glutamina	30,34	12,38
19	Histidina	29,42	12,10
20	Tirosina	5,41	9,43
21	Triptofano	15,19	13,91
22	Cistina	16,51	11,48

4.4 Determinação de aminoácidos livres nas amostras de salame

4.4.1 Efeito do ultrassom na disponibilidade de aminoácidos livres em salames

A determinação dos aminoácidos livres no ponto inicial da massa de salame (dia da fabricação) mostrou que a aplicação do ultrassom em diferentes tempos não modificou neste curto período a concentração de 17 dos aminoácidos avaliados. Os aminoácidos triptofano, histidina, glicina e ácido glutâmico apresentaram diferentes concentrações logo após a aplicação do tratamento de ultrassom (Tabela 7). Dessa forma, foi possível observar que os tratamentos com ultrassom induziram a redução nos teores de Trp e His em comparação com o tratamento controle, diferindo estatisticamente, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A concentração desses aminoácidos reduziu com o aumento da permanência das peças de salame no banho de ultrassom, indicando que o ultrassom estimula as reações que utilizam esses analitos como precursores, tais como o crescimento microbiano; enzimática, como as descarboxilases e desaminases, produzindo substâncias voláteis; ou mesmo estimulando reações químicas. Por outro lado, a isoleucina não foi detectada na etapa inicial do processo nos tratamentos controle e 3 min de ultrassom e passou a ser determinada ($0,2 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$) nos tratamentos com maior tempo de aplicação da tecnologia (Tabela 7).

Tabela 7 – Teor de aminoácidos livres (mg 100 g⁻¹) em massas de salames controle e tratados com ultrassom (3, 6, 9 min) no tempo inicial.

Aminoácido	Controle		3 min		6 min		9 min	
	Média	DP ^a	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Alanina	22,8 ± 5,3	a*	23,2 ± 1,4	a	24,8 ± 2,1	a	26,1 ± 2,3	a
Glicina	3,2 ± 2,2	a	3,6 ± 0,3	a	3,7 ± 0,2	a	4,0 ± 0,0	a
Valina	6,9 ± 0,6	a	7,1 ± 0,4	a	7,7 ± 0,8	a	7,3 ± 0,0	a
Leucina	6,9 ± 1,4	a	6,7 ± 0,1	a	6,9 ± 0,4	a	6,9 ± 0,4	a
Isoleucina	nd ^b	-	nd	-	0,2 ± 0,1		0,2 ± 0,3	
Prolina	13,9 ± 1	a	13,3 ± 1,2	a	15,1 ± 1,4	a	15,0 ± 0,2	a
Metionina	5,2 ± 0,8	a	5,3 ± 0,5	a	5,5 ± 0,4	a	4,7 ± 0,1	a
Serina	11,9 ± 2,3	a	12,2 ± 0,4	a	12,8 ± 0,7	a	12,1 ± 0,1	a
Treonina	15,2 ± 1	a	15,7 ± 0,2	a	16,0 ± 0,6	a	15,4 ± 0,5	a
Fenilalanina	3,4 ± 0,9	a	3,5 ± 0,4	a	3,6 ± 0,2	a	3,4 ± 0,1	a
Ácido aspártico	11,2 ± 0,2	a	11,2 ± 0,2	a	11,4 ± 0,5	a	11,2 ± 0,0	a
Hidroxiprolina	10,0 ± 0,4	a	9,8 ± 0,1	a	10,0 ± 0,1	a	10,1 ± 0,0	a
Ácido glutâmico	37,2 ± 11	a	29,6 ± 6,1	a	32,8 ± 0,8	a	31,8 ± 3,7	a
Arginina	11,2 ± 2,4	a	10,0 ± 1,9	a	10,6 ± 0,2	a	10,4 ± 0,8	a
Asparagina	7,7 ± 0,5	a	7,8 ± 0,5	a	8,6 ± 0,2	a	8,1 ± 0,1	a
Lisina	15,3 ± 1,8	a	14,0 ± 1	a	14,6 ± 0,2	a	13,6 ± 0,5	a
Glutamina	42,3 ± 22	a	28,0 ± 9,8	a	34,0 ± 3,7	a	25,1 ± 4,1	a
Histidina	82,9 ± 0,7	a	46,5 ± 14	b	55,5 ± 5,9	b	39,5 ± 0,4	b
Tirosina	8,4 ± 5,2	a	1,9 ± 0,4	a	3,8 ± 1,6	a	2,5 ± 0,7	a
Triptofano	543,3 ± 52	a	302,9 ± 64	b	323,0 ± 5,2	b	224,8 ± 26	b

^a Desvio padrão das médias; ^b não detectado; *Letras minúsculas diferentes na mesma linha: tratamentos (Controle, 3, 6, 9 min) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); # Teste t aplicado na comparação de médias ($p < 0,05$).

O produto atingiu as características que atendem o regulamento técnico para salame (BRASIL, 2000) aos 28 dias (Dados não mostrados neste documento). Nessas amostras, os aminoácidos majoritários foram alanina, lisina e leucina, sendo que vários outros apresentaram concentrações superiores às encontradas na massa inicial. Nesse ponto avaliado, vários aminoácidos apresentaram diferenças em teores com o emprego do ultrassom. Assim, o ácido glutâmico, arginina e treonina aumentaram a concentração com o emprego do ultrassom, principalmente nos menores tempos de exposição 3 e 6 min. Já os aminoácidos neutros não-polares

alanina, glicina, valina, leucina, prolina, metionina e tirosina (neutro polar) apresentaram uma redução nos teores em relação ao controle quando os salames foram tratados com 9 min de ultrassom, onde em todos os casos diferiram significativamente (Tabela 8). Os demais aminoácidos não apresentaram diferença significativa nas concentrações em 28 dias, apesar de alguns tenderem a reduzir (triptofano, fenilalanina, ácido aspártico e lisina). Essa mudança de concentrações observadas nos tratamentos pode influenciar diretamente no sabor final do produto, pois muitos aminoácidos são precursores de compostos voláteis importantes para caracterizar o sabor típico do produto, como o de carne maturada. Por outro lado, podem também influenciar na percepção dos gostos amargo, doce e ácido (ROSEIRO et al., 2008), principalmente quando há acentuada redução, como no tratamento 9 min de ultrassom.

O produto analisado em 120 dias representou um tempo médio atribuído ao final da vida de prateleira do salame (BRASIL, 2000). No ponto de 120 dias, foi observado que houve um acréscimo dos aminoácidos alanina e metionina, quando tratados com ultrassom, diferentemente do que foi observado nos outros períodos de maturação. A serina foi encontrada em concentrações elevadas em 3 min, por outro lado no tratamento 9 min apresentou concentração equivalente ao controle. Além disso, o tempo de 3 min foi suficiente para elevar o nível de fenilalanina (Phe) em 57% em relação a C (Tabela 9), indicando que o ultrassom exerceu um efeito positivo no aporte desse aminoácido essencial, associado ao gosto ácido (TOLDRÁ, 1998). Esse aminoácido está associado a formação de compostos voláteis aromáticos, tais como benzaldeído, fenilacetaldéido e álcool feniletílico, os quais são produtos do metabolismo microbiano de fenilalanina. Esse aminoácido é convertido inicialmente em ácido fenilpirúvico, por uma aminotransferase, e o cetoácido é ainda transformado em benzaldeído (NIEROP GROOT; DE BONT, 1998). Além disso, compostos voláteis como os hidrocarboretos aromáticos, dentre eles o tolueno, podem ser formados a partir do catabolismo da Phe (ORDÓÑEZ et al, 1999).

Tabela 8 – Teor de aminoácidos livres (mg 100 g⁻¹) em salames controle e tratados com ultrassom (3, 6, 9 min) em 28 dias de processamento.

Aminoácido	Controle			3 min			6 min			9 min		
	Média	DP ^a		Média	DP		Média	DP		Média	DP	
Alanina	161,8	± 11,2	^a	185,5	± 1,9	^a	182,0	± 4,6	^a	129,3	± 3,1	^b
Glicina	46,1	± 5,8	^a	53,6	± 2,0	^{ab}	46,7	± 4,1	^{ab}	35,8	± 3,8	^b
Valina	63,7	± 5,0	^a	69,5	± 1,2	^a	56,5	± 8,1	^{ab}	43,0	± 5,5	^b
Leucina	91,2	± 11,0	^a	99,8	± 1,5	^a	90,9	± 8,1	^{ab}	62,3	± 2,7	^b
Isoleucina	43,6	± 5,6	^a	46,0	± 1,7	^a	47,2	± 9,3	^a	27,3	± 1,6	^a
Prolina	61,8	± 6,9	^a	58,5	± 4,0	^{ab}	60,4	± 5,3	^{ab}	43,9	± 0,8	^b
Metionina	30,1	± 3,8	^a	30,4	± 3,9	^{ab}	28,7	± 4,2	^{ab}	20,0	± 0,3	^b
Serina	13,8	± 0,7	^a	16,2	± 1,6	^a	13,7	± 1,8	^a	14,1	± 0,9	^a
Treonina	15,2	± 2,0	^b	19,5	± 0,8	^a	18,7	± 1,8	^a	17,0	± 0,3	^{ab}
Fenilalanina	35,9	± 1,1	^a	41,4	± 5,2	^a	43,5	± 11	^a	26,4	± 1,5	^a
Ácido aspártico	65,4	± 4,1	^a	66,8	± 8,8	^a	61,3	± 5,8	^a	48,8	± 1,4	^a
Hidroxiprolina	10,3	± 0,1	^a	10,5	± 0,0	^a	10,8	± 0,1	^a	10,3	± 0,3	^a
Ácido glutâmico	54,8	± 6,7	^b	66,0	± 0,5	^{ab}	80,8	± 4,6	^a	54,1	± 7,8	^b
Arginina	43,1	± 2,65	^b	68,1	± 9,6	^{ab}	89,7	± 2,2	^a	61,6	± 9,1	^b
Asparagina	9,7	± 1,2	^a	9,6	± 0,6	^a	7,9	± 0,9	^a	9,1	± 1,5	^a
Lisina	135,4	± 29,1	^a	144,8	± 6,1	^a	133,0	± 15	^a	126,7	± 3,0	^a
Glutamina	nd ^b	-	-	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	-
Histidina	52,1	± 9,0	^a	62,0	± 9,2	^a	66,9	± 3,6	^a	50,8	± 0,7	^a
Tirosina	4,5	± 0,2	^a	3,0	± 0,8	^{ab}	2,3	± 0,6	^{ab}	1,9	± 0,9	^b
Triptofano	12,4	± 1,5	^a	12,0	± 1,0	^a	13,6	± 2,6	^a	8,8	± 0,1	^a

^a Desvio padrão das médias;

^b não detectado;

*Letras minúsculas diferentes na mesma linha: tratamentos (Controle, 3, 6, 9 min) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); # Teste t aplicado na comparação de médias ($p < 0,05$).

Estudos realizados por Quansah et al. (2013) em hidrolisados proteicos de uma espécie de feijão, utilizando tratamento térmico-ultra-sônico combinado (termossonicação), com 10 min de sonicação por meio de probe, demonstraram que houve um aumento do teor de Cys em 41%, aminoácido ausente em nossas amostras. Por outro lado, os mesmos autores reportaram que as concentrações de His, Phe, Tyr e Pro não se alteraram em comparação à amostra não tratada. O mesmo comportamento foi observado no presente trabalho para esses aminoácidos.

Além disso, em 120 dias, as concentrações de ácido glutâmico apresentaram um decaimento no tempo de 9 min, diferindo-o dos outros tratamentos, sendo que o ápice foi atingido quando os salames foram tratados com 6 min (Tabela 9).

Tabela 9 – Teor de aminoácidos livres (mg 100 g⁻¹) em salames controle e tratados com ultrassom (3, 6, 9 min) em 120 dias após processamento.

Aminoácido	Controle		3 min		6 min		9 min	
	Média	DP ^a	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Alanina	202,7	± 18,6	289,1	± 10,9	282,1	± 0,2	266,4	± 36,5
Glicina	60,0	± 5,8	87,1	± 8,8	82,8	± 6,7	77,6	± 23,0
Valina	79,0	± 9,7	129,8	± 5,4	116,5	± 3,7	115,4	± 23,9
Leucina	96,5	± 5,6	166,2	± 12,6	141,3	± 3,7	140,5	± 34,3
Isoleucina	44,8	± 0,9	81,8	± 4,8	69,4	± 1,2	68,9	± 18,5
Prolina	111,5	± 14,6	167,7	± 12,0	156,0	± 12,8	167,5	± 27,9
Metionina	36,6	± 1,2	56,9	± 5,0	55,1	± 4,9	56,8	± 9,6
Serina	49,8	± 4,7	70,0	± 10,2	54,4	± 15,5	43,3	± 5,3
Treonina	51,5	± 8,0	71,1	± 11,9	59,9	± 9,4	54,6	± 10,7
Fenilalanina	40,0	± 0,3	63,2	± 5,4	60,2	± 4,2	58,6	± 11,3
Ácido aspártico	111,4	± 10,6	144,7	± 6,5	166,4	± 5,5	161,4	± 41,6
Hidroxiprolina	28,1	± 0,9	28,2	± 1,0	28,2	± 0,9	43,3	± 3,6
Ácido glutâmico	111,8	± 22,2	113,9	± 8,8	131,3	± 5,0	80,5	± 2,1
Arginina	126,4	± 42,8	214,1	± 32,1	115,2	± 16,9	133,7	± 75,9
Asparagina	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
Lisina	231,0	± 38,4	297,6	± 14,6	385,9	± 10,7	300,7	± 82,5
Glutamina	nd ^b	-	nd	-	nd	-	nd	-
Histidina	75,5	± 12,0	87,0	± 8,4	83,9	± 10,8	60,4	± 8,2
Tirosina	14,7	± 2,5	26,0	± 6,3	30,6	± 13,6	13,5	± 7,2
Triptofano	23,4	± 2,2	27,4	± 10,6	29,8	± 1,3	26,2	± 5,1

^a Desvio padrão das médias;

^b não detectado;

*Letras minúsculas diferentes na mesma linha: tratamentos (Controle, 3, 6, 9 min) diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05); # Teste t aplicado na comparação de médias (p<0,05).

4.4.2 Efeito do tempo de processamento

Os salames apresentaram no tempo inicial do processamento (início da fermentação) maiores concentrações de Trp (224,8 a 543,3mg 100g⁻¹), His (39,5 a 82,9 mg 100g⁻¹), Gln (25,1 a 42,4 mg 100g⁻¹), Glu (31,8 a 37,2mg 100g⁻¹), seguidos de Ala (22,8 a 26,1mg 100g⁻¹), Lys (13,1 a 15,4 mg 100g⁻¹) e Thr (15,2 a 16 mg 100g⁻¹). Nesse mesmo ponto, a isoleucina foi detectada apenas nas amostras sonicadas por 6 e 9 minutos e, em concentrações reduzidas (0,2 mg 100g⁻¹) (Tabela 7). Entretanto, foi possível observar a sua presença em 28 e 120 dias de maturação. O catabolismo da isoleucina pode gerar aldeídos voláteis presentes em salames, como o 2-metil-butanal, bem como seus respectivos álcool (2-etil-butanol) e ácido (ácido 2-metil-butanoico), através da reação não enzimática de degradação de Strecker (TOLDRÁ; ARISTOY; FLORES, 2000; STAHNKE, 1994) ou por enzimas microbianas (BAILEY et al, 1992). Estes compostos foram encontrados por outros autores em produtos fermentados e maturados como presunto curado (FLORES; SPANIER; TOLDRÁ, 1998),

Ao contrário do nosso estudo, alguns autores não reportam a presença de triptofano em produtos fermentados maturados (ARO ARO, 2010; HUGHES, 2002). No período de 28 dias de maturação, percebeu-se que ocorreu um elevado acréscimo nos teores de todos os aminoácidos em relação ao controle, exceto para triptofano e glutamina, em que houve acentuado decréscimo, sendo degradados parcial e totalmente, respectivamente. De forma adversa ao dia 0 de maturação, as maiores concentrações encontradas foram de Ala (161,76 mg 100 g⁻¹), Lys (135,40 mg 100 g⁻¹), Leu (91,16 mg 100 g⁻¹), Asp (65,37 mg 100 g⁻¹) e Val (63,7mg 100 g⁻¹) para o salame controle, aumentando em mais de dez vezes a concentração para alguns aminoácidos em relação ao tempo inicial, repetindo esse comportamento com todos os outros tratamentos, indicando uma mudança no perfil (teor) de aminoácidos no decorrer do tempo (Figura 3). Alterações na concentração de aminoácidos livres durante a maturação também foram encontradas em embutidos fermentados semi-secos (HUGHES et al., 2002), os quais foram analisados por HPLC e encontraram maiores concentrações de Ala, Leu e Ile seguido por Glu, Arg, Lys Phe, Val, Thr, Tyr, His, Ser e Gly. Os resultados encontrados neste estudo

corroboram com os reportados por Aro Aro et al. (2010), pois encontraram a alanina, lisina e leucina como um dos aminoácidos majoritários em salames adicionados de cultura *starter Staphylococcus xylosus*. É importante mencionar que a Val e Leu, através de seu catabolismo, podem ser precursores dos aldeídos 2-metil-propanal e 3-metil-butanal (STAHNKE, 1994), respectivamente, característicos de produtos cárneos processados, sendo que a Val tem sido atribuída a propriedade “amarga” e “doce” (ROUDOT-ALGARON, 1996), principal aminoácido detectado nos presuntos portugueses de cura rápida.

No período do armazenamento, entre 28 e 120 dias foi possível observar que as concentrações de vários aminoácidos seguiram aumentando, porém em menor proporção em relação ao observado desde o período inicial até 28 dias. No armazenamento a atividade proteolítica continua ocorrendo, porém menos intensamente. Esse fato pode ter ocorrido devido à redução de atividade de água, como resultado da perda de água, que afeta a atividade de enzimas (TOLDRÁ, FLORES, SANS, 1997) e logo a liberação de aminoácidos no produto (JURADO et al., 2007).

Ademais, no período de maturação também ocorre a desidratação e mudanças no pH, o que pode contribuir para uma maior proteólise. Serina, treonina e hidroxiprolina, não tiveram suas concentrações alteradas em 0 e 28 dias, sendo que houve um acréscimo significativo nos teores em 120 dias. Lys diferiu somente entre os tempos inicial e 120 dias nos salames tratados com 6 min de ultrassom (Figura 4).

No decorrer do tempo, foi expressiva a diferença entre os teores dos aminoácidos presentes nos salames. Apresentaram ordem crescente de concentração e maiores concentrações foram encontradas em 120 dias, exceto para triptofano (Trp) (reduziu), glicina (Gln) (ausente a partir de 28 dias), asparagina (Asn) (ausente em 120 dias de maturação). Observou-se também que vários dos aminoácidos livres presentes nos salames submetidos a 3, 6 e 9 min de banho ultrassônico apresentaram comportamentos semelhantes ao controle no decorrer do tempo de maturação (Figura 4).

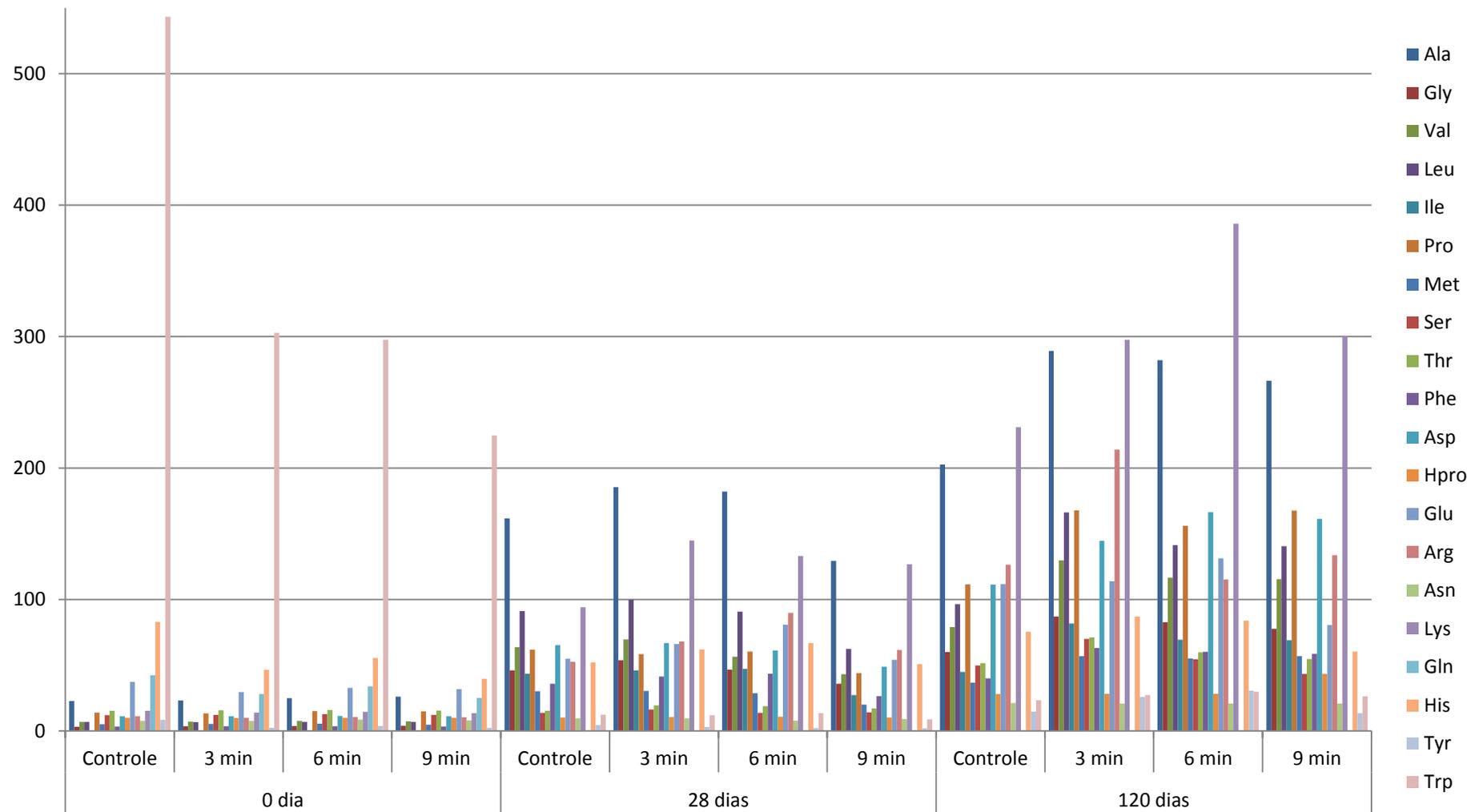


Figura 4 – Teor de aminoácidos nos diferentes tratamentos de aplicação de ultrassom durante as etapas do processamento e estocagem.

O aumento do teor dos aminoácidos livres observado entre os pontos avaliados indica alta atividade enzimática proteolítica (ARO ARO et al., 2010; TOLDRÁ, 1992; VERPLAETSE; DE BOSSCHERE; DEMEYER, 1989). Em produtos maturados, alterações proteolíticas são atribuídas a enzimas, tais como catepsinas, calpaínas e aminopeptidases. Catepsinas são ativas durante todo o processo, enquanto que calpaínas possuem sua atividade restrita ao início do estágio de maturação. A geração de aminoácidos livres se dá na última etapa do processo proteolítico pela ação de aminopeptidases exógenas em peptídeos, especialmente alanil aminopeptidase e aminopeptidase B, que tem sido caracterizadas em músculo esquelético suíno (FLORES; ARISTOY; TOLDRÁ, 1996). Essas aminopeptidases também foram encontradas durante o processo de maturação em presunto curado (TOLDRÁ et al., 1992). Em presunto curado tipo Italiano Careri et al. (1993) relacionaram o acréscimo dos aminoácidos lisina e tirosina com o aumento da qualidade no sabor de maturado, enquanto que asparagina afetou negativamente. Lisina foi encontrada como um dos aminoácidos predominantes em presuntos espanhóis (TOLDRÁ; FLORES; SANS, 1997) e foi associada ao sabor “envelhecido”, além da presença de ácido glutâmico, o qual foi atribuído características de sensoriais associados ao gosto “salgado”. A fenilalanina, tirosina e isoleucina contribuíram para a percepção do gosto ácido (CARERI et al., 1993). De forma menos pronunciada que nos presuntos crus, as quantidades dos aminoácidos citados também aumentaram durante o período avaliado para os salames avaliados neste estudo, caracterizando dessa forma a etapa de maturação.

A formulação com teor reduzido de sal (1%), utilizada para a fabricação dos salames, também pode influenciar significativamente as quantidades de aminoácidos livres encontrados no produto. SANTOS et al. (2015) reportaram a evolução desses compostos em salames produzidos com 1,25% de NaCl na formulação. A literatura reporta que em produtos fermentados maturados com teores inferiores a 2% de NaCl pode haver aumento da atividade da maioria das proteases presentes no músculo e pode haver maior ação proteolítica bacteriana ou endógena do salame (ORDÓÑEZ et al., 1999; ZAPELENA; ASTIASARÁN; BELLO, 1999), ocorrendo a liberação dos aminoácidos livres (TOLDRÁ, 1992). Em decorrência dessa liberação, os aminoácidos livres participam diretamente do aroma/sabor de alimentos fermentados e indiretamente contribuem para a formação do

desenvolvimento de aromas típicos, pois estas moléculas são precursoras dos compostos voláteis como ácidos, álcoois, aldeídos, amônia, compostos sulfurados, ésteres, entre outros (HERRANZ et al., 2003). A degradação de aminoácidos aromáticos, como observada para o triptofano pode levar à formação dos compostos voláteis acetofenona e benzaldeído (SONDERGAARD; STAHNKE, 2002), responsáveis pelo aroma do produto.

Pelo exposto, variações nas concentrações de aminoácidos livres em produtos cárneos, sobretudo em salame, podem proporcionar alterações nas características sensoriais, principalmente em relação ao sabor e aroma deste alimento.

5 CONCLUSÕES

- A técnica de cromatografia em fase gasosa equipada com detector de ionização em chamas mostrou-se adequada para a análise de aminoácidos livres em salame. Adequações no método cromatográfico, como o aumento da temperatura do injetor, ajuste de pressão e mudanças no sistema cromatográfico proporcionaram um aumento da eficiência de transferência dos analitos no injetor, seletividade e precisão analítica.
- O emprego da mistura de ACN como solvente de reação, juntamente com o agente derivatizante MTBSTFA a temperatura de 100 °C por 2 h permitiu a determinação de 22 aminoácidos livres com os parâmetros de validação alcançando níveis satisfatórios;
- O método validado permitiu a determinação dos aminoácidos livres em diferentes pontos do processo de fabricação do salame tipo Italiano, permitindo avaliar o grau de proteólise do produto durante o processamento;
- Os tratamentos de ultrassom em diferentes tempos afetaram quantitativamente vários aminoácidos no produto, o que possivelmente pode ser associado a diferenças no sabor/aroma dos produtos;
- Mais estudos são necessários para melhor compreensão dos efeitos do ultrassom e sua relação com a presença de aminoácidos livres em produtos cárneos fermentados maturados e o impacto tecnológico e sensorial.
- Por fim, ressaltamos a importância do desenvolvimento de métodos analíticos alternativos e incentivo à pesquisa em relação à determinação de aminoácidos livres em produtos cárneos, importante para o controle de qualidade dessas matrizes alimentícias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARISTOY, M. C.; TOLDRA, F. Deproteinization techniques for HPLC amino-acid-analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 39, p. 1792–1795, 1991. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00010a020>>. Acesso em: 13 out. 2013.

ARO ARO, J. M. The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. *Food Chemistry* vol. 119 p. 279–285, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609008358#>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17. ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2000. v. 2. cap 30, met. 968.11, p. 4.

BAILEY, M.E et al. In: CHARALAMBOUS, G. (Ed.), **Off-flavors in Foods and Beverages**. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, p. 127, 1992.

BARA, L. et al. Amino Acids Determination in Meat by GC-MS. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, v. 67, n. 2, 2010.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v.25, n.5, p.856-865, 2002.

BARYLKO-PIKIELNA, N.; KOSTYRA, E. Sensory interaction of umami substances with model food matrices and its hedonic effect. **Food Quality and Preference**. v. 18, n.5, p.751–758, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950329307000122>>. Acesso em: 16 out. 2013. doi: 10.1016/j.foodqual.2007.01.002.

BLAU, K.; HALKET, J. M. **Handbook of Derivatives for Chromatography**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1993.

BENEDITO, J. et al. Composition assessment of raw meat mixtures using ultrasonics. **Meat Science**, v. 5, n.4, p. 365–370, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174000001133>>. Acesso em: 26 fev. 2015.

BIERMANN, C. J. et al. Analysis of amino acids as tert.-butyldimethylsilyl derivatives by gas chromatography. **Journal of Chromatography**. v.351, p. 330-334, 1986.

BIZKARGUENAGA, E. et al. In-port derivatization after sorptive extractions **Journal of Chromatography A**, v.1296, p.36– 46, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967313005256>>. Acesso em: 08 jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Cárneos. Instruções Normativas no 20, 21 e 22, de 31 de Julho de 2000. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 de Agosto de 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Anexo XII - Regulamento técnico de identidade e qualidade do salame Tipo Italiano, Instrução Normativa n.º 22, de 31 de julho de 2000. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2000a.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003 - **Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos**. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRIN TVERSION&id=15132>>. Acesso em: 18 mar. 2015.

CÁRCEL, J.A. et al. Food process innovation through new technologies: use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v.110, n.2, p.200-207, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=2137575294&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000067446&version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=3432e4d13cc582e966281a89d8411fca&searchtype=a>. Acesso em: 25 fev. 2015.

CARERI, M. ET AL. Sensory property relationships to chemical data of Italian-type dry-cured ham. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 968-972, 1993.

CHANDRAPALA, J. et al. Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.19, n.5, p.975-983, 2012. Disponível em: <www.sciencedirect.com/pii/S1350417712000120>. Acesso em: 26 fev. 2015.

CHEMAT, F. et al. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18, n.4, p.813-835, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417710002385>>. Acesso em: 26 fev. 2015.

CHIANG, P. D.; YEN, C. T.; MAU, J. L. Non-volatile taste components of various broth cubes. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 932–937, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606001798>>. Acesso em: 16 out. 2013.

CICHOSKI, A. J., ZIS, L. C., FRANCESCHETTO, C. Características físico-químicas e microbiológicas da superfície do salame tipo italiano contendo solução de lactato de potássio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.29, n.3, p. 546-552, 2009.

COHEN, S. A.; STRYDOM, D. J. Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives. **Analytical Biochemistry**. n. 174, p. 1–16, 1988.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. (Org.). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: UNICAMP, 2006.

CORDOBA, J. J. et al. Evolution of free amino-acids and amines during ripening of Iberian cured ham. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 42, p. 2296–2301, 1994. Disponível em: <pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00046a040>. Acesso em: 10 mai. 2013.

CORNET, M.; BOUSSET, J. Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between 'red' and 'white' muscles. **Meat Science**. v. 51, p. 215–219, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174098001041>>. Acesso em: 15 ago. 2013.

DEMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**; tradução Adriano Brandelli...[et al]. – 4. Ed.-Porto Alegre: Artmed, 2010.

DICKENS, J.A. et al. Effect of ultrasonic irradiation on some physical characteristics of broiler breast muscle and cooked meat. **Poultry Science**, v.70, n.1, p.389-396, 1991. Disponível em <<http://ps.oxfordjournals.org/content/70/2/389.abstract>>. Acesso em: 26 fev. 2015.

DOLATOWSKI, Z.J. et al. Applications of ultrasound in food technology. **Technologia Alimentaria**, v.6, n.3, p.89-99, 2007. Disponível em: <http://www.food.actapol.net/pub/8_3_2007.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2015.

DROZD, J. Chemical derivatization in gas chromatography. **Journal of Chromatography Library**. v. 19, 1981.

EGEA-GONZÁLEZ, F. J. et al. Matrix-effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis. *Journal of Chromatography A*. v. 966, n.1, p. 155-165, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967302007070>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

EINARSSON, S. Selective determination of secondary amino acids using precolumn derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*.v 348, p. 213–220, 1985.

EURACHEM Work Group. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. **A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**, LGC, Teddington, UK, 1st English ed., 1998, Disponível em: <<http://www.eurachem.ul.pt/>>. Acesso em: 18 mar.2015.

FAUCHERE, J. L.; PLISKA, V. Hydrofobic parameters-pi of amino acids side-chains from the partitioning of n-acetyl-amino-acid amides. *European Journal of Medicinal Chemistry*.V.18. p. 369-375, 1983.

FLORES, M. et al. Effect of prefreezing hams on endogenous enzyme activity during the processing of Iberian dry-cured hams. **Meat Science**. v. 82, p. 241–246, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030917400900028X>>. Acesso em: 21 nov. 2013.

FLORES, M.; SPANIER, A. M.; TOLDRÁ, F. Flavour analysis of dry-cured ham F. Shahidi (Ed.), **Flavor of meat products & seafood**, Blackie A&P, Chapman & Hall, London, p. 320–341, 1998.

FLORES, M.; ARISTOY, M. C.; TOLDRÁ, F. HPLC purification and characterization of soluble alanyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 44, p. 2578-2583, 1996.

FOUNTOULAKIS, M., LAHM, H.W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. **Journal of Chromatography A**. v. 826, p.109–134, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967398007213>>. Acesso em: 21 nov. 2013.

GEHRKE C.W.; NAKAMOTO, H.; ZUMWALT, R. Gas-liquid chromatography of protein amino acid trimethylsilyl derivatives. **Journal of Chromatography A**. v. 45.p. 24-51, 1969. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301861793>>. Acesso em: 18 fev. 2015.

GEHRKE C.W.; LEIMER K. Trimethylsilylation of amino acids: Effect of solvents on derivatization using bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. *Journal of Chromatography A*, v. 53, n. 2, p. 201–208, 1970. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301984596>>. Acesso em: 18 fev.2015.

GEHRKE C.W.; LEIMER K. Trimethylsilylation of amino acids derivatization and chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 57, p. 219–238, 1971. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021967371800353>>. Acesso em: 18 fev. 2015.

GLÓRIA, M. B. A. Bioactive Amines. In: HUI, Y. H.; DUNCAN, S.; GUERRERO-LEGARRETA, I.; LI-CHAN, E.C. Y.; MANLEY, C. H.; NIP, W. K.; MCMEEKIN, T. A.; NOLLET, L. M. L. e RAHMAN, S. (Ed.). **Handbook of Food Science, Technology, and Engineering**: Taylor & Francis, v.1, cap. 13, p.32, 2005.

GÖKMEN, V.; SERPEN, A.; MOGOL, B. A. Rapid determination of amino acids in foods by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 403, p. 2915–2922, 2012.

GRATACÓS-CUBARSÍ, M. et al. Effect of pH_{24h}, curing salts and muscle types on the oxidative stability, free amino acids profile and vitamin B₂, B₃ and B₆ content of dry-cured ham. **Meat Science**. v. 141, n.3, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.016>>. Acesso em: 07 jan. 2013.

GREENE, T. W.; WUTS, P. G. M. **Protective Groups in Organic Synthesis**, 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.

HALKET, J. M.; ZAIKIN, V. G. Derivatization in mass spectrometry – 1. Silylation. **European Journal of Mass Spectrometry**. v.9, p. 1-21, 2003.

HEEMS, D. et al. Fully automated precolumn derivatization, on-line dialysis and high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in food, beverages and feedstuff. **Journal of Chromatography A**, v. 798, p. 9-17, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00219673/798/1>>. Acesso em: 14 nov. 2013.

HERRANZ et al. Use of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 763 and α -acetoglutarate to improve the sensory quality of dry fermented sausages. **Meat Science**, n. 66 p. 151–163, 2003.

HUBER, L. Validation of Analytical Methods: Review and Strategy. **LC/GC Magazine**. v.2, n 96, 1998.

INMETRO (Instituto Nacional De Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQCGCRE-008, 2003.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, DOQ-CGCRE-008. Revisão 3. Rio de Janeiro: INMETRO, 20 p., 2010.

IUPAC (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY). **Selectivity in analytical chemistry**, v 73, n.8, p.1381, 2001

JAYASOORIYA, S.D. et al. Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: a review. **International Journal of Food Properties**, v.7, n.2, p.301-319, 2004. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/JFP-120030039>>. Acesso em: 26 fev. 2015.

JAYASOORYA, S.D. et al. Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine Semitendinosus and Longissimus muscles. **Meat Science**, v.75, p.628-639, 2007. Disponível em: <www.sciencedirect.com/.../pii/S0309174006003111>. Acesso em: 26 fev. 2015.

JIMÉNEZ-MARTÍN, E. J. et al. Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for the Determination of Free Amino Acids as Their Dimethyl-tert-butylsilyl (TBDMS) Derivatives in Animal Source Food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60, p. 2456–2463, 2012. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf2052338>>. Acesso em: 16 out. 2013.

JONES, B. N.; GILLIGAN, J. P. o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. **Journal of Chromatography**. v. 266, p. 471–482, 1983.

JURADO, A. et al. Effect of ripening time and rearing system on amino acid-related flavor compounds of Iberian ham. **Meat Science**. v. 75, p. 585–594, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174006003068>>. Acesso em: 22 nov. 2013.

KASPAR, H. et al. Automated GC–MS analysis of free amino acids in biological fluids. **Journal of Chromatography B**. v. 870, p. 222–232, 2008.

KECHAOU, E. S.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; JAOUEN, P.; GOUYGOU, J. P.; BERGE, J. P.; BEN AMAR, R. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: effects on lipid distribution and amino acid composition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, p. 158–164, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172308000959>>. Acesso em: 16 out 2013.

KE LIU, J et al. Influence of re-cooking on volatile and non-volatile compounds found in silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. **Food Science and Technology**. v. 75, p. 1067–1075, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12562-009-0116-y>>. Acesso em: 15 out. 2013.

KLEIN, B.H.; DUDENHAUSEN, J.W. Ion-exchange chromatography and ion-pair chromatography. Complementation of HPLC analysis of amino acids in body fluids by pre-column derivatization using ortho-phthaldialdehyde. **Journal of Liquid Chromatography**. v. 18, n. 20, p. 4007-4028, 1995. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826079508013742#.UpDuBNK-q9c>>. Acesso em: 15 nov. 2013.

KNAPP, D.R. **Handbook of Analytical Derivatization Reaction**. Wiley, New York, 1979.

KRÁČMAR, S., LIŠKA, I., MINAŘÍK, B., ZBÍRAL, J., Amino acids determination in standard solution and feed mixture: an interlaboratory study. **Acta universitatis agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis** v. 48, p. 69–79, 2000.

LEADLEY, E.; WILLIAMS, A. Procesado com pulsos electricos, ultrasonidos de potencia y otras tecnologias emergentes. In: BRENNAM, J.G. **Manual del procesado de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 2008. Cap.7, p.203-237

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 4ª ed. São Paulo: SARVIER, 2006.

LORENZO, J. M.; BERMÚDEZ, R.; FRANCO, D. Lipolysis, proteolysis and physico-chemical modifications during ripening of dry-cured duck breast. **European Food Research and Technology** v. 236 p. 405–417, 2013 Disponível em:

<<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00217-012-1906-5>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

MANDALAKIS, M., APOSTOLAKI, M., STEPHANOU, E.G. Trace analysis of free and combined amino acids in atmospheric aerosols by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217 p. 143-150, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967309016720>>. Acesso em: 16 out. 2013.

MARSHALL, H.F.; SHAFFER, G.P.; CONKERTON, E. Free amino acid determination in whole peanut seeds. **Analytical Biochemistry**. v.180, n. 2, p. 264–268, 1989, Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269789904284>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

MARTIN, L. et al. Free amino acids and other non-volatile compounds formed during processing of Iberian ham. **Meat Science**. v. 59, p.363–368, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174001000882>>. Acesso em: 22 nov. 2013.

MARTUSCELLI, M et al. Effect of intensity of smoking treatment on the free amino acids and biogenic amines occurrence in dry cured ham. **Food Chemistry**. v. 116, p. 955–962, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609003598>>. Acesso em: 21 out. 2013. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.061.

MOORE S.; SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. Chromatography of Amino Acids on Polystyrene Resins. **Analytical Chemistry**. v. 30, n. 7, p.1185-1190, 1958. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60139a005>>. Acesso em: 21 nov. 2013

NAIR, B.M. et al. Enzymatic hydrolysis of food protein for amino acid analysis. I. Solubilization of the protein. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 24, p. 386–389., 1976. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60204a043>>. Acesso em: 22 nov. 2013.

NIEROP GROOT, M. N., DE BONT, J. A. M. Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, p.3009–3013, 1998.

NOZAL, M. J. et al. Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 1047. p. 137-146, 2004.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. Changes in the Components of Dry-Fermented Sausages during Ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, n. 4, p. 329-367, 1999. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/tandf/bfsn/1999/00000039/00000004/art00002>>. Acesso em: 21 nov.2013.

OMS-OLILU, G.; HERTOOG, M. L. A. T.; VAN de POEL, B.; AMPOFO-ASIAMA, J.; GEERAERD, A. H.; NICOLAI, B. M. Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening and postharvest shelf-life. *Postharvest Biol. Tec.*, 62: 7-16, 2011.

PEACE, R. W.; GILANI, G. S. Chromatographic determination of amino acids in foods. **Journal of AOAC International**, v.88, p. 877-887, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16001866>>. Acesso em: 19 nov. 2013.

PEREZ-PALACIOS, T.; RUIZ, J.; BARAT, J. M.; ARISTOY, M. C.; Antequera, T. Influence of pre-cure freezing of Iberian ham on proteolytic changes throughout the ripening process. **Meat Science**. v.85, p. 121-126, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174009003957>>. Acesso em: 22 nov. 2013.

PIYASENA, P. et al. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.87, p.207-216, 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=ists&_ArticleListID=2137634184&_sort=r&_st=13&view=c&acct=C000067446&version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=c9768165be503b70cbaaab4cc185b49b&searchtype=a>. Acesso em: 27 fev. 2015

PIETROGRANDE, M.C.; BASAGLIA G. Enantiomeric resolution of biomarkers in space analysis: Chemical derivatization and signal processing for gas chromatography–mass spectrometry analysis of chiral amino acids. **Journal of Chromatography A**. v.1217, p. 1126–1133, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967309014423>>. Acesso em: 24 set. 2013.

PINNA, A. et al. Volatile organic compounds of Parma dry-cured ham as markers of ageing time and aged ham aroma. **Italian Food & Beverage Technology**, p. 13-25, 2013. Disponível em: <http://issuu.com/chied/docs/13g0692_ift_71_144_dpi>. Acesso em: 20 nov. 2013.

POOLE, C. F. Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1296 p. 2–14, 2013. Disponível

em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.097>>. Acesso em: 16 Out. 2013 doi: 10.1016/j.chroma.2013.01.097.

QUANSAH J. K. et. al. The Effect of Thermal and Ultrasonic Treatment on Amino Acid Composition, Radical scavenging and Reducing Potential of Hydrolysates Obtained from Simulated Gastrointestinal Digestion of Cowpea Proteins. **Plant Foods and Human Nutrition**. v. 68, p. 31–38, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11130-013-0334-4>>. Acesso em: 14 jan. 2015.

RABIE, M. A.; PERES, C.; MALCATA, F. X. Evolution of amino acids and biogenic amines throughout storage in sausages made of horse, beef and turkey meats. **Meat Science**. v. 96, n.1, 2014, p. 82-87. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.042>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

REINA R. et al. Amino acid and nucleotide contents and sensory traits of dry-cured products from pigs with different genotypes. **Meat Science**, v. 96, n.1, p.230–236, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030917401003239>>. Acesso em: 07 jan. 2014.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova [online]**. v.27, n.5, p. 771-780, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

RIBEIRO, F. A. DE L. et al. Planilha De Validação: Uma Nova Ferramenta para Estimar Figuras de Mérito na Validação de Métodos Analíticos Univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RÖDEL, W.; STIEBING, A. Continuous measurement of the ripening pattern of dry sausage. **Fleischwirtschaft**, v. 68, p.1423-1426, 1998.

RODIER, C. et al. Chemical derivatization of amino acids for in situ analysis of Martian samples by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 915, n.1/2, p. 199–207, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301006252>>. Acesso em: 17 out. 2013.

ROUDOT-ALGARON, F. Le goût des acides aminés, des péptides et des protéines: exemple des péptides sapides dans les hydrolysats de caséines. **Le Lait**. v. 76, p. 313-348, 1996..

ROSEIRO, L. C. et al. Proteolysis in Painho de Portalegre dry fermented sausage in relation to ripening time and salt content. **Meat Science**, v. 79, p. 784–794, 2008.

SCHUMMER, C. et. al. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to CG/MS analysis. **Talanta**, v. 77, p. 1473-1482, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914008006966>>. Acesso em: 17 out. 2013.

SEGURA, J.; VENTURA, R.; JURADO, C. Derivatization procedures for gas chromatography-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. **Journal of Chromatography B**, v. 713, p.61-90, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434798000899>> Acesso em: 09 jan.2015.

SHALABY A. R..Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**. v. 29, n.7, p.675-690, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399699600066X>>. Acesso em: 15 jul. 2013.

SILVA, F.A.P. et al. The chemical and sensory qualities of smoked blood sausage made with the edible by-products of goat slaughter. **Meat Science**. v. 94 , n. 1, p. 34–38, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.01.004>> Acesso em: 18 nov. 2013.

SOBOLEVSKY, T. G. Comparison of silylation and esterification/ acylation procedures in GC-MS analysis of amino Acids. **Journal of Separation Science**. v. 26 p. 1474-1478, 2003, Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.200301492/pdf>>. Acesso em: 21 nov. 2013.

SONDERGAARD, A. K.; STAHNKE, L. H. Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum* – a comparative study in model systems. **International Journal of Food Microbiology**. v. 75, p. 99-109, 2002.

STADTMAN E. R.; LEVINE R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**. v. 25. p. 207–218, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00726-003-0011-2>>. Acesso em: 21 nov. 2013.

STAHNKE, L. H. Aroma components from dried sausage fermented with *Staphylococcus xylosus*. **Meat Science**, n. 38.p. 39-53, 1994.

STRYDOM, D. J.; COHEN, S. A. Comparison of amino acid analyses by phenylisothiocyanate and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimyl carbamate precolumn derivatisation. **Analytical Biochemistry**. v. 222, p.19–28, 1994.

TAPUHI, Y. et al. Dansylation of amino acids for high-performance liquid chromatography analysis. **Analytical Biochemistry**. V. 115, n. 1, p. 123-129, 1981. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269781905340>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

TERRA, N. N. ; FRIES, Leadir Lucy Martins ; TERRA, A. M. . Fermentação Carne - Princípios e Inovações. Revista Nacional da Carne, São Paulo, n.293, p. 79-86, 2001

TERRA, N. N. ; FRIES, L. L. M. ; TERRA, Alessandro B de M ; VALENTE, C. R. ; CICHOSKI, A. J. . Inovações na segurança alimentar. Revista Nacional da Carne, v. 1, p. 26-28, 2004.

TOLDRÁ, F.; ARISTOY, M-CONCEPCIÓN, FLORES, M. Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. **Food Research International**, v. 33, n. 4, p. 181-185, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996900000326>>. Acesso em: 31 mar 2015.

TOLDRÁ, F. Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. **Meat Science**, v.49, n.1, 1998.

TOLDRÁ, F., FLORES, M. E SANZ, Y. Dry-cured ham flavour: enzymatic generation and process influence. **Food Chemistry**. v.59 n.4, p. 523-530, 1997.

TOLDRÁ, F. The enzymology of dry-curing of meat products. In: Smulders, J.M., Toldrá, F., Flores, J., Prieto, M. (Eds.), **New technologies for meat and meat products**. The Netherlands, Audet, Nijmegen, p. 209–231, 1992.

VÁSQUES-ORTIZ, F. A. et al. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Shrimp. **Journal of Liquid Chromatography**. v. 18. N. 10, p. 2059-2068, 1995. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826079508013960#.UpENidK-q9c>>. Acesso em: 20 out. 2013.

VERPLAETSE, A., DE BOSSCHERE, M., DEMEYER, D. Proteolysis during dry sausage ripening. In: Proceedings of the 35th International Congress on Meat Science and Technology, Copenhagen, Denmark, 1989.

VIDAL-CAROU, M. C.; LATORRE-MORATALLA, M. L.; BOVER-CID, S. Biogenic amines. **Handbook of Processed Meats And Poultry Analysis** In: FRANCIS, T.(Ed.): CRC Press, cap. 31, p.665-686, 2009.

WANG, J. et al. Analysis of amino acids by gas chromatography-flame ionization detection and gas chromatography-mass spectrometry: Simultaneous derivatization of functional groups by an aqueous-phase chloroformate-mediated reaction. **Journal of Chromatography A**. v. 663, p. 71-78, 1994.

ZAHRADNÍČKOVÁ, H. et al. Determination of D- and L-amino acids produced by cyanobacteria using gas chromatography on Chirasil-Val after derivatization with pentafluoropropyl chloroformate. **Analytical Bioanalytical Chemistry** v. 388, n. 8, p.1815–1822, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-007-1411-z>>. Acesso em: 14 set 2013.

ZAPELENA, M.J.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Dry fermented sausages made with a protease from *Aspergillus oryzae* and/or a starter culture. **Meat Science**, v. 52, p. 403-409, 1999.

Apêndice A - Áreas obtidas com a utilização de piridina e acetonitrila em diferentes temperaturas de derivatização.