



ELISÂNGELA DE FÁTIMA LISBOA TAVARES

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
ACRILAMIDA EM ALIMENTOS POR
MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS E
ESPECTROSCÓPICOS NA REGIÃO DO
INFRAVERMELHO**

LAVRAS - MG

2015

ELISÂNGELA DE FÁTIMA LISBOA TAVARES

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ACRILAMIDA EM
ALIMENTOS POR MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS E
ESPECTROSCÓPICOS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química Ambiental, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Adelir Aparecida Saczk

Coorientador

Dr. Leonardo Luiz Okumura

LAVRAS - MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Tavares, Elisângela de Fátima Lisboa.

Identificação e quantificação de acrilamida em alimentos por métodos voltamétricos e espectroscópicos na região do infravermelho / Elisângela de Fátima Lisboa Tavares. – Lavras : UFLA, 2015.

115 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientadora: Adelir Aparecida Saczk.

Bibliografia.

1. Acrilamida. 2. Batata. 3. Biscoito. 4. Torrada. 5. Voltametria. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ELISÂNGELA DE FÁTIMA LISBOA TAVARES

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ACRILAMIDA EM
ALIMENTOS POR MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS E
ESPECTROSCÓPICOS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química Ambiental, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de abril de 2015.

Dr. Marcelo Firmino de Oliveira	FFCLRP
Dra. Ellem Waleska Nascimento da Fonseca	UFLA
Dr. Walclée de Carvalho Melo	UFLA
Dr. Hugo Adelante Mesquita	EPAMIG

Dra. Adelir Aparecida Saczk
Orientadora

**LAVRAS - MG
2015**

A Deus, pelo seu infinito amor.

Ao meu esposo Bruno,
por todo carinho, compreensão, incentivo e apoio.
À minha filha Maria Clara, por todo amor e carinho.
À minha orientadora Adelir, pela orientação e amizade

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por sempre se fazer presente, me guiando e iluminando, e acima de tudo, pelo seu infinito amor.

Ao meu querido esposo Bruno, meu porto seguro, por todo amor, amizade, incentivo, carinho, e compreensão nas ausências, e também por nunca me permitir desistir.

À minha querida filha Maria Clara, que chegou tão de repente, e trouxe muito amor e carinho, e por me ensinar a cada dia ser uma pessoa melhor.

Aos meus queridos pais, Furtunato e Maria das Graças, aos meus irmãos, às minhas cunhadas e cunhados, sobrinhos e afilhados, à minha sogra, e a todos os familiares pelo apoio.

À minha família de Lavras, Leite Mesquita, Sr. Hugo, Dona Ivani e Daniel, pela amizade e por sempre acolher a mim e à minha família com tanto carinho na casa deles todos esses anos.

À Profa. Adelir Aparecida Saczk, pela oportunidade oferecida, pela orientação, convivência, confiança, amizade e paciência. Além do mais, sempre torceu por mim e nunca não me deixou desistir.

Ao Prof. Leonardo Luiz Okumura (UFV), pelo acolhimento em seu laboratório, pela confiança, pelos ensinamentos e por toda ajuda para a realização deste trabalho.

Aos técnicos do LGRQ, Hέλvia e Éder, e também ao Talles, pela disponibilidade e grande contribuição nas análises do IR-FT.

Aos colegas do grupo Geap/UFV, pela ajuda na realização deste trabalho e pelos momentos de alegria e descontração.

Ao Rafael, pela amizade gratuita, conversas, incentivo, e pela grande contribuição neste trabalho.

À Shirley, que quando era secretária da pós-graduação, me deu todo auxílio nos momentos que precisei.

Aos colegas do doutorado pela amizade, apesar da pouca convivência.

A todos os professores, em especial à Zuy, que compartilharam comigo uma parcela dos seus conhecimentos;

À Dra. Ellem Waleska Nascimento da Fonseca Contado e aos Drs. Hugo Adelande Mesquita, Walcleé de Carvalho Melo e Marcelo Firmino de Oliveira, que gentilmente aceitaram o convite para compor a banca examinadora.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química pela oportunidade da realização do doutorado.

À Capes pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, a minha eterna gratidão.

“Se soubesse como Deus é bom para comigo! Mas se Ele fosse um bocadinho menos bom, continuava a achá-lo bom...”

Santa Terezinha do Menino Jesus

RESUMO GERAL

Este trabalho teve como objetivo determinar a acrilamida em alimentos pelas técnicas voltamétricas e por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Para as técnicas voltamétricas foram desenvolvidos dois métodos usando a voltametria de onda quadrada para a quantificação de acrilamida. Foram otimizados os seguintes parâmetros: frequência, amplitude e incremento de varredura. No primeiro método voltamétrico foi utilizado um eletrodo de carbono vítreo, tendo como eletrólito de suporte o tetrafluoroborato tetrabutilamônio (TBATFB) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em dimetilformamida (DMF), e sua curva analítica apresentou intervalo linear entre 100 e $600 \mu\text{g L}^{-1}$ com coeficiente de correlação $R^2 = 0,993$. No segundo método voltamétrico foi usado um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de mercúrio, tendo como eletrólito de suporte uma solução aquosa de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e sua curva analítica apresentou intervalo linear 80 a $800 \mu\text{g L}^{-1}$ com coeficiente de correlação $R^2 = 0,997$. Os dois métodos foram aplicados com sucesso para a quantificação de acrilamida em amostras de batatas “palha”, chips, biscoito e torradas, sem qualquer efeito de interferência dos metais alcalinos. A técnica FTIR foi utilizada na identificação de acrilamida sólida com KBr e acrilamida com acetonitrila. A acrilamida foi identificada em 14 amostras sólidas de alimentos. Esta técnica se mostrou promissora para a identificação, e posteriormente, quantificação de acrilamida em alimentos.

Palavras-chave: Acrilamida. Alimentos. Voltametria. FTIR.

GENERAL ABSTRACT

This study aimed to determine the acrylamide in foods by voltammetric techniques and spectrometry infrared Fourier transform (FTIR). For the voltammetric technique were developed two methods using the square wave voltammetry to realize the quantification of acrylamide. The frequency, amplitude and scan increment parameters were optimized. In the first one was used a glassy carbon electrode and the tetrabutylammonium tetrafluoroborate (TBATFB) 0.1 mol L^{-1} in dimethylformamide (DMF) was used as a supporting electrolyte. The calibration curve was linear behavior in range of 100 to 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ with the correlation coefficient $R^2 = 0.993$. In the second one, has been used a glassy carbon electrode modified with a mercury film, and the supported electrolyte was used KCl 0.1 mol L^{-1} . The calibration curve was linear range of 80 to 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ with a correlation coefficient $R^2 = 0.997$. In the both methods have been applied successfully for the quantification of AA in samples like potatoes "straw", chip, crisp biscuit without any interference effect of the alkali metals. In the FTIR method was used to identify the solid acrylamide and acrylamide with acetonitrile. The acrylamide was detected in 14 samples of solid food. This technique showed promise for identification and further quantitation of acrylamide in foods.

Keywords: Acrylamide. Food. Voltammetry. FTIR.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Estrutura molecular da acrilamida..... 16
- Figura 2 Diagrama mostrando a transformação da acrilamida no óxido glicidamida catalisada por CYP2E1.....20
- Figura 3 Mecanismo proposto para a formação de acrilamida como uma reação secundária da reação de Maillard22
- Figura 4 Mecanismo hipotético de formação de acrilamida a partir de um aminoácido e um lipídio23

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 Estrutura molecular da acrilamida.....42
- Figura 2 Avaliação do solvente (A) e tempo (B) de extração da AA.....49
- Figura 3 Voltamogramas cíclicos registrados em DMF/TBATFB 0,1 M na (...) ausência e na (___) presença de 1 mmol L^{-1} ($71,08 \text{ mgL}^{-1}$) de acrilamida sob eletrodo de carbono vítreo ($v = 60 \text{ mV s}^{-1}$)50
- Figura 4 Mecanismo proposto para a redução da acrilamida em eletrodo de carbono vítreo vs. Ag/AgCl51
- Figura 5 Voltamogramas de comparação da solução de acrilamida entre as técnicas SWV e DPV52
- Figura 6 Curva analítica obtida para acrilamida em DMF (A). Valores de I_p obtidos a partir dos voltamogramas apresentados (B)54

ARTIGO 2

- Figura 1 Efeito do eletrólito de suporte na corrente de pico de 1 mg L^{-1} de AA. KOH (A), NaNO_3 (B), KNO_3 (C), HCl (D), LiCl (E), TBATFB (F), NaCl (G) e KCl (H)..... 74
- Figura 2 Efeito da concentração de KCl na corrente de pico de 1 mg L^{-1} de AA..... 74
- Figura 3 Voltamogramas cíclicos registrados KCl $0,1 \text{ M}$ na (...) ausência e na (___) presença de 1 mmol L^{-1} ($71,08 \text{ mgL}^{-1}$) de acrilamida sob eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio ($v = 60 \text{ mV s}^{-1}$) 76
- Figura 4 Voltamogramas de comparação entre as técnicas SWV e DPV para uma solução de AA 2 mg L^{-1} em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl 78
- Figura 5 Mecanismo proposto para a redução da acrilamida em eletrodo de carbono vítreo vs. Ag/AgCl 79
- Figura 6 Curva analítica obtida para acrilamida em KCl (A). Valores de I_p obtidos a partir dos voltamogramas apresentados em B 80
- Figura 7 Curvas analíticas obtidas para AA em diferentes amostras, com $f = 100 \text{ Hz}$, $\Delta E = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 15 \text{ mV}$ em KCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$. Padrão (■), amostra 1 (●), amostra 2 (◆) e amostra 3(▼) 83

ARTIGO 3

- Figura 1 Espectros A (AA sólida), B (ACN) e C (AA em ACN) 101
- Figura 2 Espectros de IR-FT de AA padrão (AAp) e amostras de batatas chips e “palha” 102

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1	Avaliação dos parâmetros para determinação de acrilamida em solução de TBATFB/DMF	52
Tabela 2	Resultados experimentais da regressão linear e testes analíticos da curva analítica utilizando a técnica SWV	55
Tabela 3	Influência de interferentes no valor de i_p da AA	56
Tabela 4	Concentração de aa em batatas e biscoito	58

ARTIGO 2

Tabela 1	Avaliação dos parâmetros para determinação de acrilamida em solução de KCL	77
Tabela 2	Resultados experimentais da regressão linear e testes analíticos da curva analítica utilizando a técnica SWV	81
Tabela 3	Resultados de regressão linear das curvas analíticas da aa, obtidos para padrão e amostras, utilizando o eletrodo de carbono vítreo modificado com EFHG	84
Tabela 4	Concentração de aa em biscoitos e torrada.....	85

ARTIGO 3

Tabela 1	Metodologias analíticas relevantes para determinação de AA	96
----------	--	----

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	História da acrilamida	16
2.2	Acrilamida em alimentos	17
2.3	Aspectos toxicológicos da acrilamida	19
2.4	Formação da acrilamida nos alimentos	21
2.5	Métodos analíticos para determinação de acrilamida	24
2.6	Determinação de acrilamida por métodos voltamétricos	28
2.7	Determinação de acrilamida por métodos espectroscópicos de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	32
	REFERÊNCIAS	34
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	40
	ARTIGO 1 Desenvolvimento de uma metodologia eletroquímica para determinação de acrilamida em alimentos	40
1	INTRODUÇÃO	42
2	EXPERIMENTAL	46
2.1	Reagentes	46
2.2	Medidas voltamétricas	46
2.3	Deteção voltamétrica da acrilamida	47
2.4	Preparo das amostras	48
3	RESULTADOS	49
3.1	Solvente e tempo de extração	49
3.2	Caracterização voltamétrica da acrilamida	50
3.2.1	Comportamento voltamétrico da acrilamida no modo redução	50
3.2.2	Mecanismo de redução da acrilamida	51
3.3	Condições experimentais	51
3.4	Análise do desempenho do método	53
3.4.1	Curva analítica	53
3.4.2	Estudo da especificidade	56
3.4.3	Análise das amostras	57
4	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	61
	ARTIGO 2 Desenvolvimento de uma metodologia eletroquímica para determinação de acrilamida em alimentos usando um eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio	65
1	INTRODUÇÃO	67
2	EXPERIMENTAL	70
2.1	Reagentes	70

2.2	Medidas voltamétricas	70
2.3	Preparo do eletrodo modificado com filme de mercúrio - EFHg....	71
2.4	Detecção voltamétrica da acrilamida.....	71
2.5	Preparo das amostras.....	72
3	RESULTADOS	73
3.1	Eletrólito de suporte.....	73
3.2	Caracterização voltamétrica da acrilamida	75
3.2.1	Comportamento voltamétrico da acrilamida no modo redução	75
3.3	Condições experimentais.....	77
3.3.1	Mecanismo de redução da acrilamida	78
3.4	Análise do desempenho do método	80
3.4.1	Curva analítica	80
3.4.2	Estudo da especificidade	82
3.4.3	Análise das amostras	84
4	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS	88
	ARTIGO 3 Estudo da aplicabilidade da FTIR no modo ATR na identificação de acrilamida em alimentos	92
1	INTRODUÇÃO	94
2	EXPERIMENTAL	98
2.1	Reagentes e método de extração	98
2.2	Espectroscopia de infravermelho.....	98
2.3	Análise das amostras por FTIR	99
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
3.1	Análise Qualitativa	100
4	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS	106
	ANEXOS	109

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos processados é alto, principalmente devido as facilidades de preparo, ou por poderem ser consumidos imediatamente. Para que se tenha um consumo seguro de alimentos processados, faz-se necessário o controle de qualidade destes. A qualidade do alimento processado vai desde o aspecto visual, sensorial e também a presença de contaminantes.

A acrilamida (AA) é um monômero usado na produção de poliacrilamida desde a década de 50. As poliacrilamidas são utilizadas nas indústrias de papel, têxteis e na construção de túneis. Na construção de um túnel na Suécia houve um vazamento de água e este foi selado com poliacrilamida. O excesso de poliacrilamida foi parar na água do vazamento chegando então nos rios e solo da região, provocando a morte de peixes e animais, além de contaminar plantações.

Hoje se sabe que a principal via de formação da acrilamida em alimentos é reação um aminoácido (principalmente asparagina) reagente com a carbonila de um açúcar redutor. Esta reação acontece quando alimentos ricos em carboidratos são submetidos a temperaturas superiores a 120°C.

Portanto, faz-se necessário o aprofundamento dos conhecimentos quanto a formação da acrilamida em alimentos, sua toxicidade, formas de reduzir e também determinação da AA.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 História da acrilamida

A acrilamida é um monômero sólido branco, inodoro, solúvel em água, metanol, etanol, acetona, acetato de etila e insolúvel em benzeno e heptano. Também é conhecida como prop-2-enamida (C_3H_5NO), possui massa molecular 71 g mol^{-1} , e sua estrutura molecular está representada na Figura 1. A alta solubilidade em água desta molécula está atribuída à presença da função amida polar, e sua capacidade de polimerização é devido ao grupo vinil.

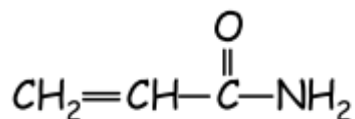


Figura 1 Estrutura molecular da acrilamida

Desde a década de 50, a acrilamida vem sendo produzida comercialmente pela indústria a partir da hidratação da acrilonitrila. Esta reação leva à formação de poliacrilamidas, que são usadas na produção de géis para eletroforese e para clarificar e purificar água potável e esgoto. A acrilamida também é usada na construção de fundações para barragens e túneis (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2002a).

A acrilamida tornou-se um problema em 1997, após um grave vazamento de água durante a construção de um túnel para ferrovia na Suécia. Para conter esse vazamento testaram-se vários selantes, sem sucesso. Optou-se então pelo gel selante composto de acrilamida e metilacrilamida, identificado

como rhoca-gil, Rhone-Poulenc (ERIKSSON, 2005; HAGMAR et al., 2001; REYNOLDS, 2002).

Entre agosto e setembro de 1997 usou-se 1400 toneladas do gel selante contendo acrilamida. Após este período, observou-se a morte de vários peixes e outros animais próximos ao local da construção. O vazamento de uma grande quantidade de acrilamida e metilacrilamida não polimerizado, durante o procedimento de selagem das paredes do túnel para o meio ambiente pode ter sido a causa. Após análises do sangue de vários trabalhadores da construção do túnel, verificou-se a presença de doses elevadas de acrilamida. Como consequência da contaminação ambiental, autoridades suecas determinaram a destruição de produtos alimentares locais e o abatimento do gado. A construção do túnel foi interrompida após os incidentes e retomada em 2004 (ERIKSSON, 2005; REYNOLDS, 2002).

2.2 Acrilamida em alimentos

Segundo Ariseto e Toledo (2006) a acrilamida em alimentos foi descoberta por pesquisadores da Universidade de Estocolmo. O primeiro órgão a fazer um estudo sobre a determinação de acrilamida em produtos disponíveis no mercado, confirmando sua presença em diferentes níveis, em muitos alimentos processados termicamente, foi a Agência Nacional de Alimentos da Suécia.

Após esta descoberta, vários países confirmaram a presença de acrilamida em alimentos. As pesquisas mostraram que produtos à base de batata, como batatas fritas e batatas chips, torradas, biscoitos, cereais matinais e café, apresentaram os maiores teores de acrilamida. Isso significa que alimentos ricos em carboidratos quando submetidos a temperaturas superiores a 120°C, apresentavam altos níveis de acrilamida. Por outro lado, alimentos que não eram assados ou fritos durante seu processamento ou preparação, e alimentos ricos em

proteínas, não apresentavam níveis significativos de acrilamida, e tampouco a presença do contaminante foi detectada em alimentos crus ou cozidos em água (ARISSETO; TOLEDO, 2006).

Os aminoácidos livres (principalmente asparagina), açúcares redutores e condições de processamento como: a temperatura, a umidade, o tempo de cozimento, são fatores que afetam a formação da acrilamida. Os produtos a base de batata e de panificação representam cerca de 50% e 20% da exposição humana à acrilamida, respectivamente (ERIKSSON, 2005; KERAMAT et al., 2011).

Há vários estudos com o objetivo de reduzir o teor de acrilamida em diversos tipos de alimentos. Casado, Sánches e Montaña (2010) estudaram o efeito de diversos aditivos (compostos contendo enxofre, sais, aminoácidos, antioxidantes e vários produtos naturais, como orégano, alecrim e alho) no teor de acrilamida e na qualidade sensorial de azeitonas pretas maduras. As azeitonas foram tratadas com estes aditivos antes da esterilização. O alho e a arginina apresentaram uma redução no teor de acrilamida, mas comprometeram a qualidade sensorial. O bissulfito de sódio apresentou uma redução significativa no teor de acrilamida, sem comprometer a qualidade sensorial. No entanto, na Espanha, onde foi realizado este trabalho, o bissulfito de sódio é proibido para azeitonas de mesa, mas a quantidade adicionada foi inferior à permitida para alimentos secos, como damasco, uva e pêsego.

Arruda (2008) desenvolveu um método capaz de reduzir a quantidade de asparagina (precursor da acrilamida) em alimentos processados termicamente. O método desenvolvido propõe um contato do alimento a base de batata, contendo asparagina com uma solução para lixiviamento, para extrair a asparagina. Após este processo o alimento apresentou níveis mais baixos de acrilamida do que um produto a base de batata não-lixiviado e termicamente processado.

Outra forma de reduzir o teor de acrilamida em alimentos processados termicamente é utilizar espécies de vegetais que contenham menor quantidade do aminoácido asparagina, principal responsável pela formação de acrilamida (KERAMAT et al., 2011).

2.3 Aspectos toxicológicos da acrilamida

Em estudos com animais, verificou-se que a acrilamida é rapidamente absorvida por todas as vias de exposição, sendo mais rápida por via oral. Após a exposição, a acrilamida e a glicidamida são metabolizadas e distribuídas por todos os tecidos do corpo (WHO, 2002b).

A acrilamida produz efeitos tóxicos agudos apenas por doses orais superiores a 100 mg kg^{-1} de peso corporal, e doses letais são geralmente superiores a 150 mg kg^{-1} de peso corporal. Esta é metabolizada ao epóxido glicidamida por meio de uma reação catalisada pela enzima CYP2E1 (Figura 2), tendo como caminho alternativo a conjugação com a glutatona. A acrilamida e seus metabólitos são rapidamente eliminados pela urina. A biodisponibilidade absoluta da acrilamida varia de 23 – 48% em roedores para uma dose de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ peso corporal administrada na dieta por um período de 30 minutos (WHO, 2005).

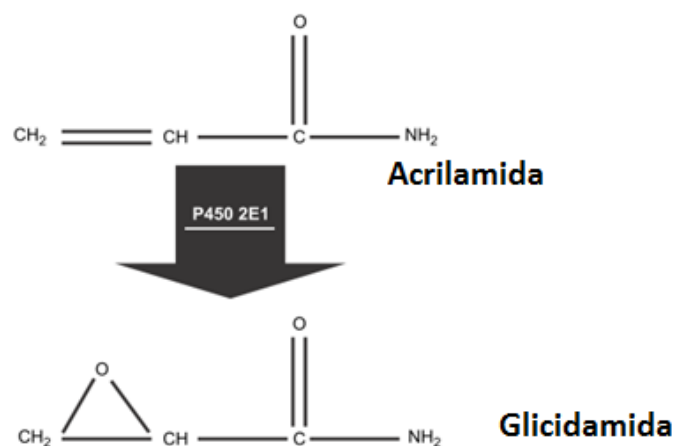


Figura 2 Diagrama mostrando a transformação da acrilamida no óxido glicidamida catalisada por CYP2E1

Fonte: (BESARATINIA; PFEIFER, 2007).

Estudos realizados com várias espécies animais têm mostrado que a acrilamida possui ações tóxicas, principalmente no sistema nervoso (WHO, 2005). Os sintomas gerados são considerados leves (irritação nos olhos e sistema respiratório, dormências nas mãos e pés) e reversíveis após 18 meses de tratamento (HAGMAR et al., 2001), mas, segundo Zhu et al. (2008), a neurotoxicidade da acrilamida necessita de maior investigação.

Um estudo realizado em um hospital do norte da Itália, com 326 pacientes com câncer de pâncreas e 652 pessoas de controle, não encontrou relação entre acrilamida na dieta e câncer pancreático, no entanto, os pesquisadores indicam novas pesquisas antes de chegar a uma conclusão definitiva (PELUCHI et al., 2011).

Desde 2007, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), tem recomendado a seus Estados-Membros o monitoramento dos níveis

de acrilamida em alimentos, e seus resultados devem ser enviados para a comissão para a avaliação. Os resultados obtidos até 2012 mostram que são necessárias novas medidas de gestão de riscos para reduzir ainda mais a presença de acrilamida nos alimentos. Em junho de 2015 a EFSA irá divulgar um relatório com recomendações preliminares sobre a investigação futura sobre a acrilamida envolvendo seres humanos, e também os métodos de detecção e avaliação de risco de mutação de células germinativas. Atividade de coleta de dados também pode ser melhorada, principalmente para fornecer uma indicação mais precisa dos níveis de acrilamida nos alimentos produzidos e consumidos em casa (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA, 2014).

2.4 Formação da acrilamida nos alimentos

Após a descoberta da ocorrência de acrilamida em alimentos ricos em carboidratos, e processados termicamente, pesquisadores do mundo inteiro começaram a investigar quais seriam os seus precursores e seu mecanismo de formação, sugerindo que a acrilamida é formada durante a reação de Maillard (FRIEDMAN, 2005).

A acrilamida é formada basicamente pelo aminoácido asparagina e açúcares redutores (glicose, frutose), dependendo das condições de armazenamento, temperatura de cozimento, e concentração dos precursores no alimento (ARISSETO; TOLEDO, 2006; KERAMAT et al., 2011; VINCI; MESTDAGH; MEULENAER, 2012).

Segundo levantamento realizado por Vinci, Mestdagh e Meulenaer (2012), o principal mecanismo de formação da acrilamida envolve a reação de um composto de carbonila (α - hidroxicarbonil) com a asparagina, levando à formação de n-glicosil e à uma base de schiff descarboxilado. Durante esta

reação há formação de diversos intermediários altamente reativos, levando à formação da acrilamida (Figura 3).

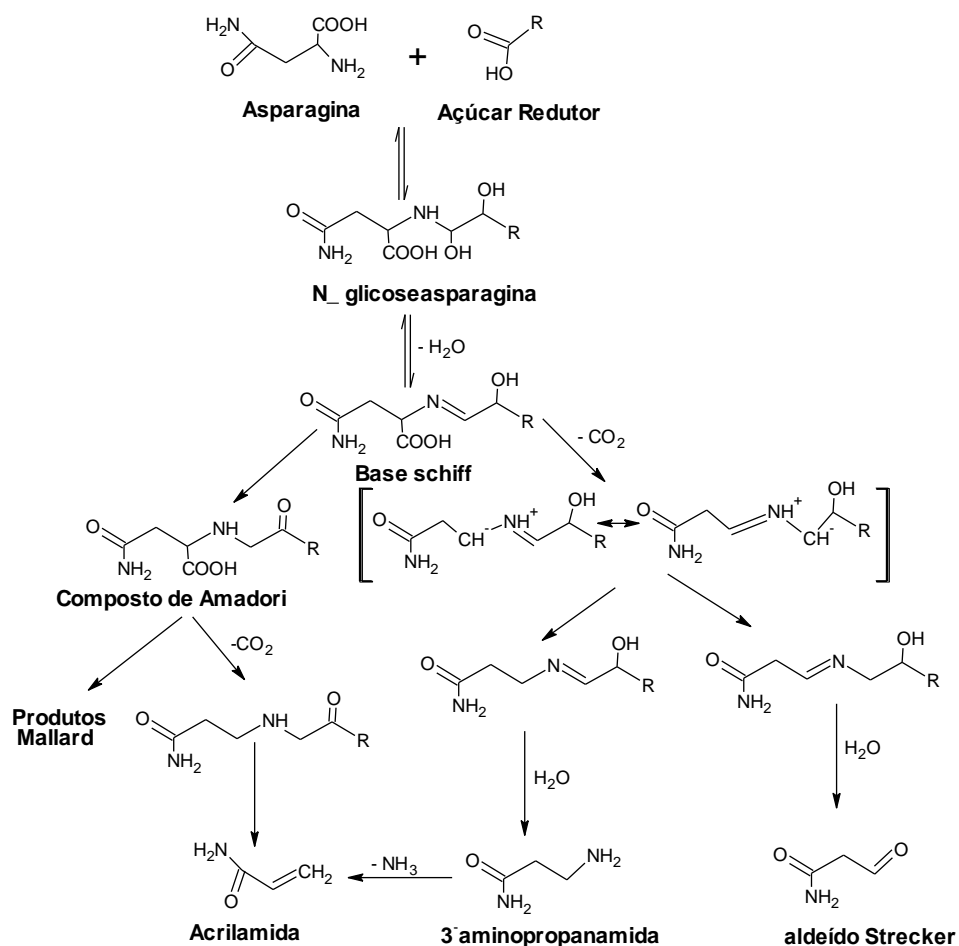


Figura 3 Mecanismo proposto para a formação de acrilamida como uma reação secundária da reação de Maillard

Fonte: (VINCI; MESTDAGH; MEULENAER, 2012).

Yasuhana et al. (2003) sugerem que a acrilamida pode ser formada a partir de aminoácidos e lipídios (Figura 4). Quando um lipídio é submetido a altas temperaturas levam a formação de acroleína, que é facilmente oxidado,

formando o ácido acrílico. Este pode reagir com o amoníaco, produzido a partir da asparagina, para formar a acrilamida.

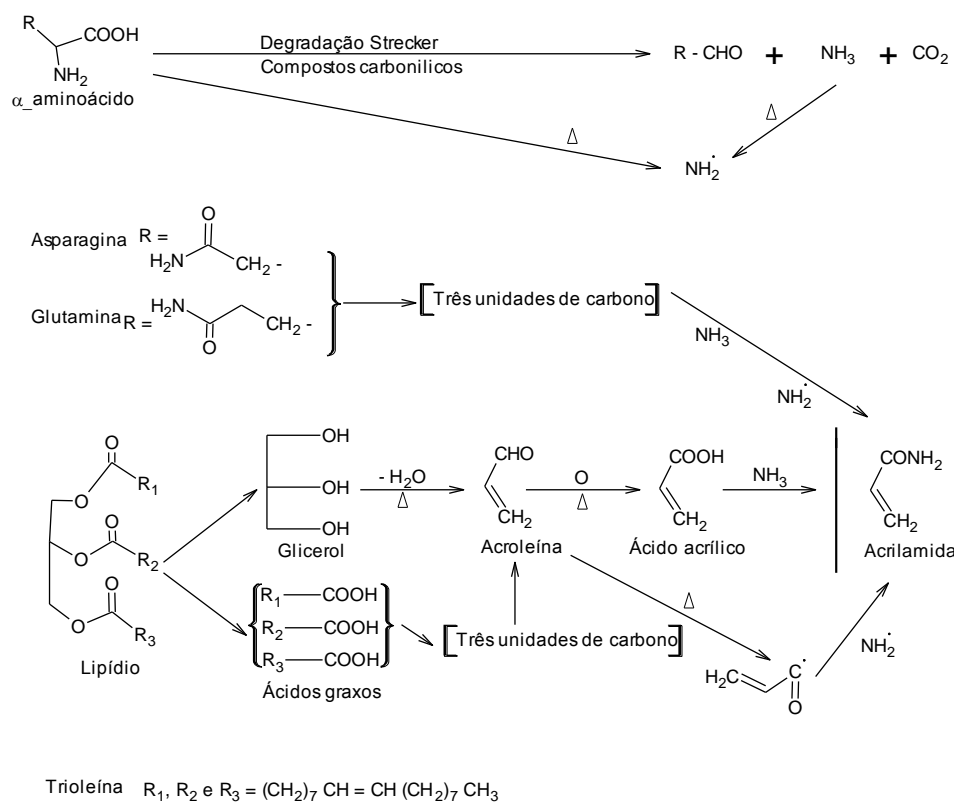


Figura 4 Mecanismo hipotético de formação de acrilamida a partir de um aminoácido e um lipídio

Fonte: (YASUHARA et al., 2003).

Claus et al. (2006) propõem que acrilamida pode ser formada a partir da pirólise em proteína de glúten. Neste estudo, os autores removeram a asparagina e os açúcares redutores, concentrando então, o glúten. Após este procedimento o glúten foi seco e submetido a uma variação de temperatura de 160 a 240°C em um intervalo de 8 a 12 minutos, e posteriormente analisados em um

cromatógrafo líquido com detector espectrômetro de massa (LC/MS), encontrando uma quantidade significativa de acrilamida.

2.5 Métodos analíticos para determinação de acrilamida

Em 2002, na Suécia, foram relatados níveis elevados de acrilamida em alimentos ricos em carboidratos e processados termicamente à temperatura superior a 120°C. Com isso, houve um número significativo de publicações científicas, porém, poucos trabalhos relatavam técnicas para a determinação desta substância. A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE/UV) e o método aplicado para determinação de acrilamida eram os propostos por diretrizes internacionais como ISO 17025 e CEN (ANESE; SUMAN; NICOLI, 2009; ERICKISON, 2003 apud WENZL; DE LA CALLE; ANKLAM, 2003; VAINIO, 2003; VALENZUELA; RONCO, 2007).

Desde então, têm surgido várias metodologias para a determinação de acrilamida. A maioria das metodologias disponíveis para determinação de acrilamida em alimentos envolvem as técnicas cromatográficas em fase líquida e gasosa, e técnicas de extração.

Nielsen et al. (2006) utilizaram a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplado a um espectrômetro de massa em tandem (HPLC/MS-MS), para determinação de acrilamida e seus precursores, asparagina, glicose, sacarose e frutose em pão. Os melhores resultados foram encontrados para a acrilamida e seu principal precursor, a asparagina. As recuperações para a acrilamida e asparagina foram 93 a 112% e 97 a 101%, respectivamente, com limites de detecção de 13 mg kg⁻¹ e 2 mg kg⁻¹, respectivamente.

Outro trabalho utilizando a mesma técnica foi desenvolvido por Bermudo et al. (2006) para determinação de acrilamida em churros, batata frita, biscoitos e pães. O método obteve uma média de 85% de recuperação, limites de

detecção de 250 pg g⁻¹ para curva padrão e 45 ng g⁻¹ para a curva construída na presença de uma matriz (pão), com precisão de 3,3 e 8%, respectivamente.

Backe, Yingling e Johnson (2014) realizaram a determinação da acrilamida em água de abastecimento usando cromatografia líquida e espectrometria de massas. A acrilamida foi extraída de bebidas aquosas por meio de uma troca de solventes. Em uma alíquota da amostra foram feitas duas adições de acetonitrila, e após cada adição, o volume foi reduzido. Por fim, adicionou-se diclorometano e realizou-se a injeção no cromatógrafo. As amostras foram analisadas diretamente utilizando um volume de injeção (750 µL). O limite de detecção do método foi de 2,4 ng L⁻¹ e de quantificação foi de 17 ng L⁻¹. A porcentagem de recuperação da acrilamida ficou de 95,0 ± 2,8% e o efeito de matriz foi de 12,0 ± 2,2% em água de rio.

Para a determinação de acrilamida em diversos alimentos, Hoenicke et al. (2004) utilizaram HPLC/MS-MS e cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massa em tandem (CG/MS-MS). O primeiro método permitiu uma análise de até 60 amostras por dia, de alimentos a base de batata, cereais, pão e café torrado. O segundo método possuiu uma preparação mais complicada e demorada, mas permitiu a análise em amostras difíceis como cacau, café solúvel, malte e melão. O limite de quantificação e detecção para HPLC/MS-MS foi de 30 µg kg⁻¹ e 10 µg kg⁻¹, respectivamente, e para CG/MS-MS foram de 5 µg kg⁻¹ e 1,5 µg kg⁻¹, respectivamente.

Zhang et al. (2005) determinaram acrilamida em cereais de arroz infantil, usando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa em tandem de alta resolução, e ionização por electrospray (LC-(ESI)MS/MS). A fase móvel utilizada neste trabalho foi uma solução aquosa contendo 10% de ácido fórmico e 0,1% de metanol. Os resultados obtidos para determinação de acrilamida se mostraram de acordo com o determinado pelo Comité Científico da Toxicidade Ecotoxicidade e do

Ambiente (CSTEE) da União Europeia, em 2001. Os autores usaram dois intervalos lineares de concentração de 0,1 a 5 ng mL⁻¹ e 5 a 200 ng mL⁻¹ com coeficientes de correlação linear variando de 0,9929 a 0,9992. O uso de dois intervalos é justificado pelo fato da faixa de 0,1 a 200 ng mL⁻¹ ser grande para a quantificação em matrizes alimentares que possuem nível residual de acrilamida.

Acrilamida foi determinada em amostras de batata e produtos a base de cereais, por Govaert et al. (2006) HPLC/MS. Para as análises, os autores usaram uma coluna de fase reversa e d₃-acrilamida como padrão interno, obtendo-se 10 µg kg⁻¹ e 20 µg kg⁻¹ como limites de detecção e quantificação, respectivamente. A faixa linear estudada foi de 0 a 1000 µg kg⁻¹, com um coeficiente de correlação linear de 0,9995 e recuperação de 100 a 115%. Segundo os autores, o método proposto pode ser usado com sucesso para análise de rotina de acrilamida em batatas e produtos a base de cereais.

Aguas et al. (2006) desenvolveram uma metodologia para a determinação de acrilamida em amostras de café e cacau por diluição isotópica. Os pesquisadores utilizaram padrão interno ¹³C₃-acrilamida e um equipamento HPLC/MS. A curva analítica foi linear no intervalo de 0,2 a 2,5 ng mL⁻¹ com coeficiente de correlação linear de 0,9999. Este método apresentou duas características importantes: a precisão e a capacidade de concentrar acrilamida, pois esta foi detectada em níveis de pelo menos 12,3 mg kg⁻¹ de amostra de café ou cacau.

Um estudo realizado com 111 amostras divididas em 19 categorias de produtos comercializados no Brasil encontrou concentração de acrilamida variando de 20 a 2528 µg kg⁻¹. A técnica utilizada neste estudo foi a HPLC/MS. Os limites de detecção e quantificação encontrados foram 10 µg kg⁻¹ e 20 µg kg⁻¹, respectivamente, com recuperação variando de 100 a 115% (ARISSETO et al., 2007).

Albishriet e El-Hady (2014) desenvolveram um método utilizando um líquido iônico “eco-friendly” com ultrassom para a extração seletiva e determinação por HPLC de acrilamida, em amostras de pães e batatas chips. A presença de sais fosfatos na fase polar (fase móvel) reduz a interação da acrilamida com a fase não polar (fase estacionária). Os autores sugerem que isso ocorre por uma ligação de hidrogênio entre o grupo NH_2 da acrilamida com o grupo fosfato. Assim, com o método proposto, foi possível determinar acrilamida em amostras de alimentos. Os extratos das amostras de batata frita foram obtidos pela imersão das amostras em 1-butil-3-metilimidazólio brometo ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$) por 30 min. Para as amostras de pão foi realizado o mesmo procedimento, porém, com um tempo de 60 min. Em seguida, a acrilamida foi separada por HPLC usando uma coluna C_{18} (Luna), fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 25°C , fase móvel foi 100% de água ultrapura, o detector utilizado foi UV no comprimento de onda de 250 nm e o tempo de corrida foi de 12 min. A extração mostrou-se eficiente e com uma boa repetibilidade, apresentando um desvio-padrão de 4.5%. O limite de detecção foi de 25 ng mL^{-1} e o limite de quantificação foi de 80 ng mL^{-1} . Os testes de recuperação ficaram entre 90,6% e 109,8%. Desta forma, os autores concluíram que o método proposto foi eficiente para a extração e a determinação de acrilamida.

Para determinação de acrilamida em amêndoas (*Prunusdulcis*) Zhang et al. (2011) utilizaram a técnica LC-ESI-MS/MS. Neste estudo os autores levaram em consideração variedade das amêndoas, o tempo e condições de armazenagem, temperatura de torrefação, ano e local de colheita. Eles verificaram que a variedade, safra, local e ano de colheita, não influenciaram significativamente no teor de acrilamida. Em relação a temperaturas de torrefação superiores a 182°C , houve um aumento do teor de acrilamida, porém, em temperaturas abaixo de 146°C os teores de acrilamida encontrados foram inferiores a $200\mu\text{g L}^{-1}$.

Liu et al. (2014) realizaram a determinação em alimentos termicamente processados utilizando a técnica por fluorescência. Para a determinação de acrilamida, o composto foi degradado através da reação de Hofmann gerando o vinil amina e a leitura realizada em 480 nm. A faixa linear de determinação para as concentrações de acrilamida foi de 0,05 até 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficiente de correlação $R^2 = 0,9935$. O limite de detecção da acrilamida foi de 0,015 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a porcentagem de recuperação para amostras de alimentos foi de 66,0 a 110,6%.

Segundo Viswanathan, Radecka e Radecki (2009), a pesquisa voltada para a análise de alimentos é muito importante, devido a expansão do comércio de alimentos, à maior mobilidade, e ao aumento da população. Com isso, o controle de qualidade dos alimentos é essencial para a proteção dos consumidores e indústria alimentar.

As técnicas de separação como HPLC, GC e eletroforese capilar são as mais tradicionais na determinação de acrilamida em alimentos. No entanto, os biossensores eletroquímicos são promissores na análise de acrilamida em alimentos, pois, não necessitam de equipamentos sofisticados, e ainda podem ser miniaturizados. Além disso, suas análises são rápidas e simples, possuem alta sensibilidade e seletividade (ORACZ; NEBESNY; ZELEWICZ, 2011).

2.6 Determinação de acrilamida por métodos voltamétricos

Niaz et al. (2008) determinaram acrilamida em solução aquosa em pH neutro usando polarografia de pulso diferencial. A faixa de potencial estudada foi de -1,60 a -1,97 V, tendo como eletrólito de suporte o LiCl 0,5 mol L⁻¹. A corrente de pico foi linear na faixa de concentração de 0,2 a 20 mg L⁻¹ com coeficiente de correlação linear igual a 0,9998. O limite de detecção foi de 27 $\mu\text{g L}^{-1}$, apresentando boa reprodutibilidade com RSD de 0,3 % (n = 16). O método

foi aplicado com sucesso para a quantificação de acrilamida em amostras de água, sem qualquer efeito de interferência de metais alcalinos.

Veselá e Šucman (2013a) realizaram a determinação de acrilamida em rações para cão e gato, utilizando a voltametria de redissolução adsortiva. Foram analisados cinco diferentes tipos de ração para cão, e três tipos de ração para gato. Para a extração foi utilizado um aparelho de ultrassom, e para as análises voltamétricas foi utilizado um eletrodo de gota de mercúrio, como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl (KCl_{sat}) como eletrodo de referência e um eletrodo de carbono vítreo como eletrodo auxiliar. Utilizou-se ainda, uma solução de tampão de amônia como eletrólito de suporte. Foi possível detectar uma variação de concentração de acrilamida nas amostras secas de rações, a qual a ração para cão apresentou cerca de 106 a 358 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e a ração de gato apresentou cerca de 66 a 269 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A precisão da análise expressa em forma de desvio padrão variou entre 0,6 – 1,7%.

Em outro trabalho, Veselá e Šucman (2013b) determinaram a presença de acrilamida em alimentos, utilizando voltametria de redissolução adsortiva. O Ni^{2+} foi adicionado à solução formando um complexo com a acrilamida, sendo este complexo eletroativo podendo então ser determinado por voltametria. Os experimentos foram conduzidos em uma solução tampão de amônia com o pH = 9,5. A concentração ideal de Ni^{2+} foi de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os melhores resultados para o preparo da amostra, foi utilizando uma mistura de etanol e água em uma proporção de 1:2 com o pH = 1,4. A acrilamida foi extraída utilizando um equipamento de ultrassom e em seguida centrifugada. Para os experimentos voltamétricos utilizou-se um eletrodo gotejante de mercúrio como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl (KCl_{sat}) como eletrodo de referência, e eletrodo de carbono vítreo como eletrodo auxiliar. Os voltamogramas foram obtidos com potencial de depósito (E_d) = -0,72 V e potencial final (E_f) = -0,05 V, velocidade (v) = 5 mV s^{-1} , tempo de depósito (t_d) = 300 s, corrente de pulso = 50 mV. Foram

analisadas amostras de pão torrado, migalhas, pães assados, biscoitos e batatas chips, a qual a porcentagem de recuperação de acrilamida por meio do complexo acrilamida/ Ni^{2+} chegou próximo de 100%. Desta forma a utilização da voltametria de redissolução adsortiva, mostrou-se eficiente para a determinação de acrilamida.

Para a determinação de acrilamida em batata frita, Zargar, Sahraie e Khoshnam (2009) usaram a voltametria de onda quadrada com eletrodo de mercúrio em solução aquosa. Os pesquisadores adicionaram cobalto (II) à solução de acrilamida, formando assim, um complexo, e este apresentou um pico catalítico em -1,35 V, que foi proporcional a concentração da acrilamida. A curva analítica mostrou-se linear na faixa de concentração de 200 a 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ com coeficiente de regressão de 0,9989. O limite de detecção foi de 3,52 $\mu\text{g L}^{-1}$. Este método não foi sensível à presença de altas concentrações de cátions de metais alcalinos, especialmente Na^+ , que geralmente está presente em grandes quantidades em amostras reais. Este método foi comparado com a técnica HPLC acoplado ao detector UV-Vis, e seus resultados foram equivalentes, com erro relativo variando de 1,5 a 4,25 %.

González-Fuentes et al. (2014) realizaram a análise eletroquímica de acrilamida utilizando um eletrodo impresso carboxilado com camada simples de nanotubo de carbono (COOH-SWCNT-SPEs). Para as análises voltamétricas cíclicas foi utilizado um potenciostato-galvanostato Epsilon BASi. Eletrodos impressos comerciais modificados com carboxilas funcionalizadas e camadas simples de nanotubo de carbono (COOH-SWCNT-SPEs, tipo: 110-SWCNT, DropSens, Oviedo, Spain), como eletrodo de trabalho, um fio de carbono, como contra-eletrodo, e prata, como quasi-referência. O sinal de redução da acrilamida foi proporcional à concentração a baixos valores (abaixo de 300 mmol L^{-1}), e foi observado que a sensibilidade ocorreu devido a adsorção da acrilamida sobre COOH-SWCNT-SPEs, que foi demonstrada utilizando a resposta eletroquímica

do complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ e espectroscopia de Raman. O limite de detecção foi de $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de $0,04 \text{ mmol L}^{-1}$ em batata frita. Também foi comparado utilizando-se o método de quantificação pela técnica HPLC, e ambas apresentaram valores similares.

Stobiecka, Radecka e Radecki (2007) determinaram acrilamida em batata frita usando um eletrodo de pasta de carbono modificado com hemoglobina (Hb-Fe(III)). A interação da acrilamida com a hemoglobina pode ser observada pela diminuição da corrente de pico do processo de redução do Hb-Fe³⁺/Fe²⁺-Hb. O limite de detecção encontrado foi de $1,2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$. Os autores deste estudo sugerem que a diminuição da corrente de pico pode ser tratada como um sinal analítico.

Para determinação de ácido acrílico (produto da hidrólise da acrilamida) em solução aquosa, Krajewska, Smet e Radecka (2009) utilizaram um eletrodo de ouro modificado com monocamadas de moléculas de tetralactamas e seu percussor ativo. O presente eletrodo mostrou-se promissor para a determinação de ácido acrílico, usando as técnicas de voltametria de onda quadrada (SWV), voltametria cíclica e espectroscopia de impedância faradaica.

Sun et al. (2013) realizaram o desenvolvimento de um novo sensor eletroquímico utilizando células de feocromocitoma e a sua avaliação em relação acitotoxicidade da acrilamida. Em seu trabalho foi monitorado o efeito tóxico da acrilamida em células de feocromocitoma. A superfície do eletrodo foi modificada com nanopartículas de ouro, e reduzida eletroquimicamente com óxido de grafeno. Foi utilizada voltametria cíclica, espectroscopia de impedância e voltametria de pulso diferencial, para caracterizar o eletrodo modificado. O sensor desenvolvido apresentou boa correlação logarítmica com o valores de células, variando de $1,6 \times 10^4$ a $1,6 \times 10^7$ células por mL^{-1} com valor de desvio padrão de 1,68%. Os valores obtidos com a voltametria de pulso diferencial diminuíram com a concentração de acrilamida em uma faixa de $0,1 - 5 \text{ mmol L}^{-1}$

com limite de detecção $0,04 \text{ mmol L}^{-1}$. O sensor provou ser uma ferramenta importante para a sondagem da toxicidade de células, e um assistente no desenvolvimento de rotulagem, simples, rápido e um método imediato de detecção.

Um eletrodo de vidro (ITO) modificado com hemoglobina e nanopartículas de ouro foi estudado por Garabagiu e Mihailescu (2011) para determinação amperométrica de acrilamida, por meio de um mediador redox o ferrocianeto de potássio. O sinal analítico neste caso foi dado pela redução da corrente de pico do ferrocianeto de potássio provocado pela passivação da superfície do eletrodo pelo analito. A faixa linear encontrada foi de 4×10^{-8} a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com coeficiente de correlação linear de 0,9994, tendo como limite de detecção $4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. O eletrodo modificado mostrou-se promissor para determinação de acrilamida em diversos tipos de alimentos.

A descrição sobre as técnicas eletroanalíticas nas modalidades voltamétricas, cíclica, pulso diferencial, e onda quadrada, estão relatadas no anexo I. Nesta descrição são explicados brevemente, o princípio de cada modalidade voltamétrica e o sinal de excitação.

2.7 Determinação de acrilamida por métodos espectroscópicos de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é muito utilizada na caracterização de compostos orgânicos, e também do grau de polimerização de diversos monômeros, como a acrilamida. Exemplos de polímeros derivados de acrilamida que foram caracterizados pela técnica espectroscopia de infravermelho: poli(acrilamida-g-óxido de propileno) (SADICOFF; BRANDÃO; LUCAS, 2001), poliacrilamida-co-metilcelulose (ALVES et al., 2011) e poliacrilamida (WANG; DU; YU, 2013).

Pedreschi, Segtnan e Knutsen (2010) fizeram o monitoramento on-line de gordura, matéria seca e acrilamida em batatas fritas, usando interactância infravermelho próximo (NIR) e de imagem reflectância visuais. Eles analisaram 60 amostras e suas médias VIS e espectros NIR foram modelados contra valores de referência, usando mínimos quadrados parciais de regressão. Os valores encontrados para gordura e matéria seca foram 0,99 e 0,86% (m/m), respectivamente, sendo que a correlação dos valores previstos, e valores de referência encontrados para gordura e matéria seca foram 0,99% e 0,97%, respectivamente. Para a acrilamida a correlação entre os valores previstos e os valores de referência foi de 0,83, indicando que o sistema pode ser usado para separar amostras com teores muito elevados de acrilamida e com média de baixos teores.

Ayvaz et al. (2013) estudaram a possibilidade do uso da microespectroscopia infravermelho médio (IRMS) como um método rápido para a detecção da acrilamida em batatas fritas. Inicialmente, a acrilamida foi quantificada por LC-MS / MS, e os mesmos extratos foram usados no IRMS com e sem limpeza com SPE. Os coeficientes de correlação variaram de 0,91 a 0,92 para as amostras

A FTIR tem sido muito utilizada na monitoração da polimerização da acrilamida, mas não se tem relatos de mais trabalhos referentes a determinação de acrilamida utilizando esta técnica.

No anexo II está descrito um breve relato sobre a técnica FTIR.

REFERÊNCIAS

- AGUAS, P. C. et al. Analysis of acrylamide in coffee and cocoa by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 385, n. 8, p. 1526-1531, Aug. 2006.
- ALBISHRI, H. M.; EL-HADY, D. A. Eco-friendly ionic liquid based ultrasonic assisted selective extraction coupled with a simple liquid chromatography for there liable determination of acrylamide in food samples. **Talanta**, London, v. 118, p. 129-136, Jan. 2014.
- ALVES, T. V. G. et al. Thermal analysis characterization of PAAm-co-MChydrogels. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Oxford, v. 106, n. 3, p. 717-724, 2011.
- ANESE, M.; SUMAN, M.; NICOLI, M. C. Technological strategies to reduce acrylamide levels in heated foods. **Food Engineering Reviews**, Dordrecht, v. 1, n. 2, p. 169-179, Dec. 2009.
- ARISSETO, A. P. et al. Determination of acrylamide levels in selected foods in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 24, n. 3, p. 236-241, Mar. 2007.
- ARISSETO, A. P.; TOLEDO, M. C. F. Acrilamida em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 2, p.123-134, 2006.
- ARRUDA, L. E. **Método para redução do teor de asparagina em um produto ou ingrediente alimentício e método para a redução da formação de acrilamida em produtos alimentícios processados termicamente**. BR n. PI0806384-2 A2, 21 jan. 2008.
- AYVAZ, H. et al. Application of infrared microspectroscopy and chemometric analysis for screening the acrylamide content in potato chips. **Analytical Methods**, London, v. 5, n. 8, p. 2020-2027, 2013.
- BACKE, W. J.; YINGLING, V.; JOHNSON, T. The determination of acrylamide in environmental and drinking waters by large-volume injection: hydrophilic-interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1334, p. 72-78, Mar. 2014.

BERMUDO, E. et al. Determination of acrylamide in foodstuffs by liquid chromatography ion-trap tandem mass-spectrometry using an improved clean-up procedure. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 559, n. 2, p. 207-214, Feb. 2006.

BESARATINIA, A.; PFEIFER, G. P. A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2007.

CASADO, F. J.; SÁNCHEZ, A. H.; MONTAÑO, A. Reduction of acrylamide content of ripe olives by selected additives. **Food Chemistry**, Oxford, v. 119, n. 1, p. 161-166, Mar. 2010.

CLAUS, A. et al. Pyrolytic acrylamide formation from purified wheat gluten and gluten-supplemented wheat bread rolls. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 50, n. 1, p. 87-93, Jan. 2006.

ERIKSSON, S. **Acrylamide in food products**: identification, formation and analytical methodology. 2005. 75 p. Thesis (Ph.D. in Environmental Chemistry) - Stockholm University, Stockholm, 2005.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Acrylamide**. Parma, 2014.
Disponível em:
<<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/acrylamide.htm?p=10>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

FRIEDMAN, M. Biological effects of Maillard browning products that may affect acrylamide safety in food. In: FRIEDMAN, M.; MOTTRAM, D. S. (Ed.). **Chemistry and safety of acrylamide in food**. New York: Springer, 2005. p. 135-155.

GARABAGIU, S.; MIHAILESCU, G. Simple hemoglobin-gold nanoparticles modified electrode for the amperometric detection of acrylamide. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 659, n. 2, p. 196-200, Aug. 2011.

GONZÁLEZ-FUENTES, F. J. et al. Electrochemical analysis of acrylamide using screen-printed carboxylated single-walled carbon nanotube electrodes. **Electroanalysis**, New York, v. 26, n. 5, p. 1039-1044, May 2014.

GOVAERT, Y. et al. Optimisation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of acrylamide in foods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 556, n. 2, p. 275-280, Feb. 2006.

HAGMAR, I. et al. Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, Stockholm, v. 27, n. 4, p. 219-226, 2001.

HOENICKE, K. et al. Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 520, n. 1/2, p. 207-215, Aug. 2004.

KERAMAT, J. et al. Acrylamide in baking products: a review article. **Food and Bioprocess Technology**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 530-543, May 2011.

KRAJEWSKA, A.; SMET, M.; RADECKA, H. Tetralactam-modified gold electrodes for amperometric detection of acrylic acid. **Supramolecular Chemistry**, London, v. 21, n. 6, p. 520-531, 2009.

LIU, C. et al. Fluorescence determination of acrylamide in heat-processed foods. **Talanta**, London, v. 23, p. 95-100, June 2014.

NIAZ, A. et al. A new simple sensitive differential pulse polarographic method for the determination of acrylamide in aqueous solution. **Talanta**, London, v. 74, n. 5, p. 1608-1614, Feb. 2008.

NIELSEN, N. J. et al. A liquid chromatography: tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in bread. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 557, n. 1/2, p. 211-220, Feb. 2006.

ORACZ, J.; NEBESNY, E.; ZELEWICZ, D. Z. New trends in quantification of acrylamide in food products. **Talanta**, London, v. 86, p. 23-34, Oct. 2011.

PEDRESCHI, F.; SEGTMAN, V. H.; KNUTSEN, S. H. On-line monitoring of fat, dry matter and acrylamide contents in potato chips using near infrared interactance and visual reflectance imaging. **Food Chemistry**, Oxford, v. 121, n. 2, p. 616-620, July 2010.

PELUCCHI, C. et al. Dietary acrylamide and pancreatic cancer risk in an Italian case-control study. **Annals of Oncology**, Dordrecht, v. 26, p. 1910-1915, Feb. 2011.

REYNOLDS, T. Acrylamide and cancer: tunnel leak in Sweden prompted studies. **Journal of National Cancer Institute**, Oxford, v. 94, n. 12, p. 876-878, 2002.

SADICOFF, B. L.; BRANDÃO, E. M.; LUCAS, E. F. Copolimerização Micelar de Poli (Acrilamida-g-Óxido de Propileno): avaliação reológica e caracterização de suas soluções. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 11, n. 2, p. 41-50, 2001.

STOBIECKA, A.; RADECKA, H.; RADECKI, J. Novel voltammetric biosensor for determining acrylamide in food samples. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 22, n. 9/10, p. 2165-2170, Apr. 2007.

SUN, X. et al. Development of a novel electrochemical sensor using pheochromocytoma cells and its assessment of acrylamide cytotoxicity. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 44, p. 122-126, June 2013.

VAINIO, H. Acrylamide in heat-processed foods: a carcinogen looking for human cancer? **European Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 18, n. 12, p. 1105-1106, 2003.

VALENZUELA, R.; RONCO, A. M. M. Acrilamida em los alimentos. **Revista Chilena de Nutricion**, Santiago, v. 34, n. 1, mar. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182007000100001>. Acesso em: 10 mar. 2015.

VESELÁ, H.; ŠUCMAN, E. Determination of Acrylamide in dry feedstuff for dogs and cats. **Acta Veterinaria Brno**, Brno, v. 82, n. 2, p. 203-208, 2013a.

VESELÁ, H.; ŠUCMAN, E. Determination of Acrylamide in food using adsorption stripping voltammetry. **Czech Journal of Food Sciences**, Prague, v. 31, n. 4, p. 401-406, July 2013b.

VINCI, R. M.; MESTDAGH, F.; MEULENAER, B. Acrylamide formation in fried potato products: present and future, a critical review on mitigation strategies. **Food Chemistry**, Oxford, v. 133, n. 4, p. 1138-1154, Aug. 2012.

VISWANATHAN, S.; RADECKA, H.; RADECKI, J. Electrochemical biosensors for food analysis. **Monatshefte für Chemie**, Wien, v. 140, n. 8, p. 891-899, Aug. 2009.

WANG, Y.; DU, R.; YU, T. Systematical method for polyacrylamide and residual acrylamide detection in cosmetic surgery products and example application. **Science and Justice**, New York, v. 53, n. 3, p. 350-357, Sept. 2013.

WENZL, T.; DE LA CALLE, M. B.; ANKLAM, E. Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, n. 10, p. 885-902, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Acrylamide in food**: frequently asked questions. Geneva, 2002a. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/acrylamide_faqs.pdf>. Acesso em: 23 maio 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food and Drug Administration. Acrylamide. In: _____. **Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting, joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA)**. Rome, 2005. p. 7-17.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food and Drug Administration. Health implications of acrylamide in food. In: _____. **Report of a joint FAO/WHO consultation**. Geneva, 2002b. p. 1-39.

YASUHARA, A. et al. Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 14, p. 3999-4003, July 2003.

ZARGAR, B.; SAHRAIE, N. R.; KHOSHNAM, F. Catalytic square-wave voltammetric determination of acrylamide in potato chips. **Analytical Letters**, New York, v. 42, n. 10, p. 1407-1417, 2009.

ZHANG, G. et al. Acrylamide formation in almonds (*Prunus dulcis*): influences of roasting time and temperature, precursors, varietal selection, and storage. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 15, p. 8225-8232, Aug. 2011.

ZHANG, Y. et al. Determination of acrylamide in infant cereal-based foods by isotope dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 551, n. 1/2, p. 150-158, Oct. 2005.

ZHU, Y. J. et al. Effects of Acrylamide on the nervous tissue antioxidant system and sciatic nerve electrophysiology in the rat. **Neurochemical Research**, New York, v. 33, n. 11, p. 2310-2317, Nov. 2008.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 Desenvolvimento de uma metodologia eletroquímica para
determinação de acrilamida em alimentos**

Elisângela de Fátima Lisboa Tavares¹

Rafael Machado Félix de Lima

Adelir Aparecida Saczk

Leonardo Luiz Okumura

Marcelo Firmino de Oliveira

Zuy Maria Magriotis

Artigo normalizado conforme a NBR 6022 (ABNT, 2003).

¹ Doutorado em Agroquímica pela Universidade Federal de Lavras
tavareslisboa@yahoo.com.br

RESUMO

O eletrodo de carbono vítreo (GCE) foi utilizado para determinação de acrilamida (AA), através de um método simples e sensível. Em uma solução de tetrafluoroborato de tetrabutilamônio (TBATFB) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em dimetilformamida (DMF), a AA apresentou um pico catódico bem definido a $-2,3 \text{ V}$ para uma faixa de potencial de -1 a $-2,7 \text{ V}$. A técnica utilizada para a quantificação da AA foi a voltametria de onda quadrada (SWV), e em condições otimizadas a corrente de pico apresentou-se linear em toda a faixa de concentração de 100 a $600 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ com coeficiente de correlação $R^2 = 0,993$. O método mostrou boa repetibilidade com RSD de $2,23\%$ ($n = 12$). O limite de detecção (LD) e o de quantificação (LQ) foi de $27,47$ e $98,22 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O método foi aplicado com sucesso para a quantificação de AA em amostras de batatas “palha”, chips e biscoito, sem qualquer efeito de interferência dos metais alcalinos.

Palavras-chave: Batata. Biscoitos. Voltametria de onda quadrada.

1 INTRODUÇÃO

A acrilamida também conhecida como prop-2-enamida é um monômero sólido branco, inodoro, solúvel em água, metanol, etanol, acetona, acetato de etila, e insolúvel em benzeno e heptano (Figura 1). A alta solubilidade em água é atribuída à presença da função amida polar, e sua capacidade de polimerização é por causa do grupo vinil.

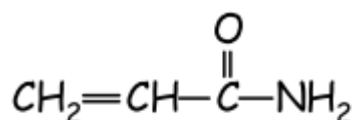


Figura 1 Estrutura molecular da acrilamida

A acrilamida tornou-se destaque no cenário mundial após o vazamento de água durante a construção de um túnel para ferrovia na Suécia, sendo necessário a utilização da acrilamida como selante para conter o vazamento. No entanto, parte da acrilamida escoou juntamente com a água do vazamento chegando aos rios da região (PÄIVIÖ; WALLENTINUS, 2001). Nesta ocasião, o nível de acrilamida encontrado no sangue de pessoas que não tiveram exposição direta foi elevado, gerando uma grande preocupação (HAGMAR et al., 2001). Desde então, iniciou-se uma série de pesquisas para detecção e formas de controle na formação da acrilamida em alimentos.

Em 1994, a acrilamida foi classificada como possível carcinógeno humano (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 1994), e em estudos com animais verificou-se que a

acrilamida é rapidamente absorvida por todas as vias de exposição, sendo mais rápida por via oral. Após a exposição à acrilamida e à glicidamida, estas são metabolizadas e distribuídas por todos os tecidos do corpo (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2002).

Segundo Bergark (1997) as fontes de exposição de acrilamida conhecidas antes do vazamento eram água, cosméticos e fumaça de cigarro, mas estes eram considerados insignificantes para explicar os níveis de adutos de acrilamida encontrados em indivíduos não expostos, sugerindo que haveria uma nova fonte de exposição. A ocorrência de acrilamida na fumaça de cigarro poderia indicar que esta substância era formada durante combustão incompleta ou aquecimento de matéria orgânica.

A acrilamida também é formada a partir de alimentos ricos em carboidratos, principalmente o aminoácido asparagina, quando submetidos a altas temperaturas. Vivanti, Finotti e Friedman (2006) estudaram o teor de asparagina e açúcares redutores em nove espécies de batatas comercializadas na Itália, e 22 espécies comercializadas nos Estados Unidos. Os teores de asparagina encontrados variaram de 1,17 a 57,65 mmol kg⁻¹.

A acrilamida tem sido estudada em diversas matrizes: batata frita (GONZÁLEZ-FUENTES et al., 2014; KRAJEWSKA; RADECKI; RADECKA, 2008; LAUZURICA; FAYOS, 2007; MICHALAK; GUJSKA; KLEPACKA, 2011; MORALES et al., 2014; STOBIECKA; RADECKA; RADECKI, 2007; ZARGAR; SAHRAIE; KHOSHNAM, 2009), água (BACKE; YINGLING; JOHNSON, 2014; NIAZ et al., 2008), azeitonas maduras (CASADO; SÁNCHEZ; MONTAÑO, 2010),

amêndoas (ZHANG et al., 2011), Sangue (VIKSTRÖM et al., 2011), biscoito (ISLEROGLU et al., 2012; LU; ZHENG, 2012), café (ALVES et al., 2010; ANESE et al., 2014; PASTORIZA; RUFÍÁN-HENARES; MORALES, 2012), batatas e cereais (ZHANG et al., 2007a), café e cacau (AGUAS et al., 2006), omelete e bolo (ZHANG et al., 2007b), ração para cães e gatos (VESELÁ; ŠUCMAN, 2013), pães e batatas (ALBISHRI; EL-HADY, 2014), batata, frango e pães (LIU et al., 2014), Biscoito (ISLEROGLU et al., 2012), matrizes biológicas (KIM et al., 2015).

No Brasil Arisseto e Toledo (2008) fizeram uma estimativa da ingestão de acrilamida usando dados fornecidos pela Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), que foi conduzida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), de julho de 2002 a junho de 2003. Com os dados fornecidos pela pesquisa fez-se então uma estimativa de ingestão de acrilamida expressos em kg per capita diária. Os pesquisadores fizeram análises dos principais alimentos adquiridos pelos consumidores. Os valores médio de ingestão de acrilamida para médios e grandes consumidores foram estimados em 0,14 e 0,42 $\mu\text{g kg}^{-1}/\text{pc}/\text{dia}$, respectivamente. O principal responsável pela exposição de acrilamida foi a batata frita, seguida do café, farinha de mandioca torrada, biscoito salgado e pão francês.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com diversos detectores é a técnica mais comumente utilizada para a determinação de acrilamida nas mais variadas matrizes. No entanto, outras técnicas têm sido cada vez mais aplicadas para esse fim, como a cromatografia gasosa (GC), fluorescência e os métodos eletroquímicos.

Métodos eletroquímicos permitem a análise direta em diversas amostras, e na maioria dos casos não é necessário um pré-tratamento da mesma, apenas uma extração simples. Além disso, os métodos eletroanalíticos permitem análise de materiais coloridos ou partículas sólidas dispersos na solução. Na análise de acrilamida em alimentos, os métodos eletroanalíticos já foram aplicados utilizando eletrodo de mercúrio (NIAZ et al., 2008; ZARGAR; SAHRAIE; KHOSHNAM, 2009) ou biosensores (STOBIECKA; RADECKA; RADECKI, 2007). Neste contexto, este trabalho propõe o desenvolvimento de um método voltamétrico para determinação de acrilamida em batatas palha, usando eletrodo de carbono vítreo.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes

Todos os reagentes químicos eram de grau analítico e foram utilizados sem purificação adicional. Foram preparadas soluções estoque (1000 mg L^{-1}) de acrilamida (Sigma 99%) aquosa e em dimetilformamida (Synth 99,8%). As diluições foram feitas por meio da transferência de alíquotas quantitativas da solução estoque para um balão volumétrico de 10,0 mL, e completando-se o volume.

Os reagentes utilizados para as soluções de eletrólitos de suporte usadas foram os seguintes: NaOH (99,0%) e KCl (97,0%) adquiridos da Synth (Brasil); KOH (85,0%), LiCl (99,0%), CrCl₃ (97,0%), KNO₃ (99,0%), NH₄Cl (99,5%), HCl (36,5%) e HNO₃ (65%), adquiridos da Vetec (Brasil); solução tampão carbonato (pH 10) e tetrabutilamônio tetrafluoroborato (TBATFB) com pureza de 95,0%, adquiridos da Acros Organics (Bélgica).

2.2 Medidas voltamétricas

As medidas voltamétricas foram realizadas em um equipamento potenciostato N Autolab PGSTAT 128 (Eco-Chemie, Utrecht, Holanda), (Eco-Chemie, Utrecht, Países Baixos) em interface com um microcomputador. O General Purpose Electrochemical System (GPES) software (Versão 4.9) foi usado para a aquisição de dados. BF₄⁻ 0,1 mol L⁻¹ (10,0 mL) foi usado como eletrólito de suporte. Foram usados os

eletrodos de carbono vítreo (GCE), com área geométrica de $0,071 \text{ cm}^2$ (trabalho), um fio de Pt (indicador) e Ag|AgCl (KCl_{sat}) (referência). Todos os eletrodos foram adquiridos da Metrohm (Suíça). Antes de cada medição voltamétrica, a superfície do eletrodo de GCE foi polida com alumina, $0,3$ e $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ (Buehler - EUA) sobre uma almofada de polimento alumina (Buehler - USA) por alguns minutos, e em seguida, lavada com água purificada.

2.3 Detecção voltamétrica da acrilamida

As voltametrias de pulso diferencial (DPV) e onda quadrada (SWV) foram aplicadas para a determinação de acrilamida. Os parâmetros voltamétricos para DPV (amplitude, velocidade e tempo de pulso), e SWV (amplitude, frequência e incremento de varredura), foram otimizados, e a curva analítica foi construída por adição de alíquotas de acrilamida na célula eletroquímica, contendo a solução de eletrólito de suporte, para se obter as concentrações que variam 100 a $600 \mu\text{g L}^{-1}$. A curva analítica foi obtida por meio de regressão linear dados de ajuste dos mínimos quadrados, traçando o pico de corrente *versus* a concentração de acrilamida. Ao estudar a precisão (reprodutibilidade e repetibilidade) do método eletroanalítico e verificar a interferentes, foram realizados experimentos de recuperação utilizando amostras comerciais de batatas “palha” e biscoitos brasileiros.

2.4 Preparo das amostras

As amostras de batatas palha, chips e biscoito foram adquiridas no comércio local, e cada amostra foi macerada com almofariz, empregando-se um pistilo, e armazenada em frasco. Pesou-se cerca de 0,7 g desta amostra em um tubo de ensaio, e posteriormente, adicionou-se 7 mL de solvente (DMF, acetonitrila e metanol), deixando no ultrassom por 5, 10, 15 e 20 minutos. Em seguida, centrifugou-se por 10 minutos a uma rotação de 4000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desengordurado com hexano, e a fase polar foi coletada e analisada no sistema voltamétrico.

3 RESULTADOS

3.1 Solvente e tempo de extração

Avaliou-se o solvente de extração e tempo de agitação no ultrassom das amostras de batatas “palha” e chips, e biscoito, de forma univariada. A extração foi estudada com os solventes ACN, DMF e MeOH com um tempo de agitação fixado em 15 minutos, cujos resultados são apresentados nas Figuras 2A e 2B. Os solventes que apresentaram as maiores correntes de pico (I_p) foram a ACN e o DMF, sendo o DMF escolhido como solvente extrator da AA, por ser o meio de trabalho. Os tempos de agitação no ultrassom estudados foram 5, 10, 15 e 20 minutos para o solvente DMF. O tempo escolhido foi de 10 minutos.

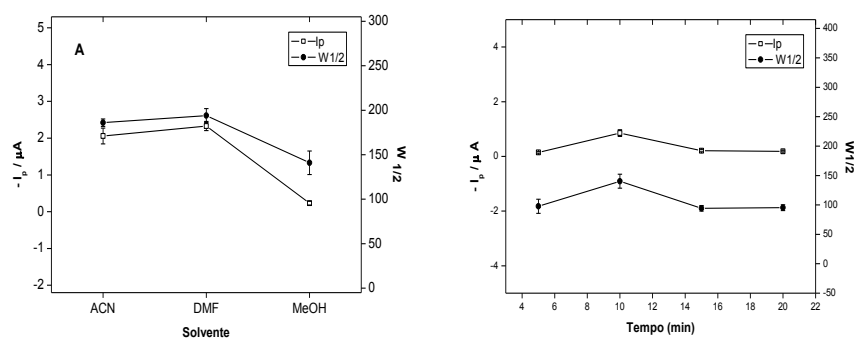


Figura 2 Avaliação do solvente (A) e tempo (B) de extração da AA

3.2 Caracterização voltamétrica da acrilamida

3.2.1 Comportamento voltamétrico da acrilamida no modo redução

O comportamento voltamétrico da AA foi investigado em eletrodo de carbono vítreo, por meio da redução eletroquímica, em meio DMF/TBATFB 0,1 mol L⁻¹. Foi estudado o intervalo de potenciais de -1 a -3 V, verificando-se a presença de um pico catódico referente a redução do composto ($E_p = -2,3$ V vs Ag|AgCl, KCl 3 mol L⁻¹) e ausência de pico anódico na varredura reversa de potencial em velocidade de 60 mV s⁻¹, conforme mostrado na Figura 3.

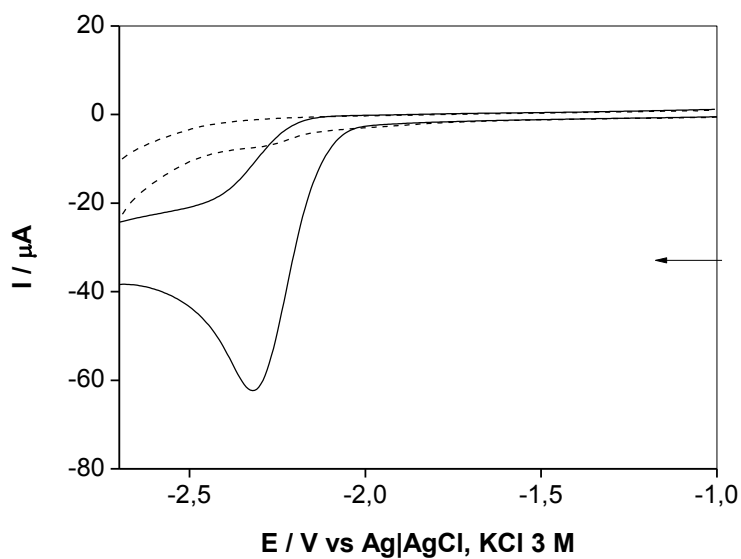


Figura 3 Voltamogramas cíclicos registrados em DMF/TBATFB 0,1 M na (...) ausência e na (—) presença de 1 mmol L⁻¹ (71,08 mgL⁻¹) de acrilamida sob eletrodo de carbono vítreo ($v = 60$ mV s⁻¹)

3.2.2 Mecanismo de redução da acrilamida

Niaz et al. (2008) propôs o mecanismo de redução da acrilamida em meio aquoso, usando um eletrodo de mercúrio (Figura 4). A acrilamida perde dois elétrons formando um diânion, que é estabilizado por próton, gerando apenas uma onda catódica. A forma ceto é favorecida em relação a forma enol (menos estável). Este mecanismo sugere um equilíbrio entre a acrilamida e a propanamida.

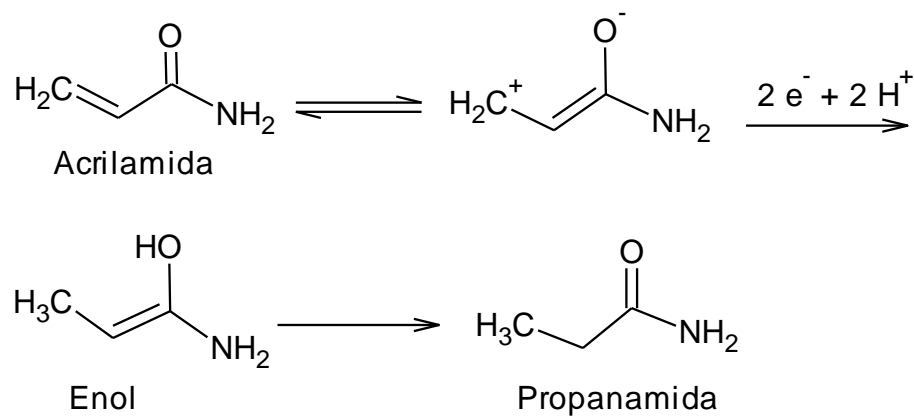


Figura 4 Mecanismo proposto para a redução da acrilamida em eletrodo de carbono vítreo vs. Ag/AgCl

3.3 Condições experimentais

Para o estudo das melhores condições experimentais das técnicas SWV) e DPV utilizou-se uma solução de AA 2 mg L⁻¹ em 0,1 mmol L⁻¹ de TFBTBA/DMF. Para a técnica de SWV avaliou-se os parâmetros: amplitude (ΔE), frequência (f) e incremento de varredura (ΔE_s), e para a

técnica de DPV avaliou-se os parâmetros: amplitude (ΔE), velocidade (v) e tempo de pulso (t_p) (Tabela 1).

Tabela 1 Avaliação dos parâmetros para determinação de acrilamida em solução de TBATFB/DMF

Voltametria de onda quadrada			Voltametria de pulso diferencial		
Parâmetro	Intervalo	Melhor sinal	Parâmetro	Intervalo	Melhor sinal
ΔE (mV)	5 - 150	50	ΔE (mV)	5 - 150	90
f (Hz)	8 - 150	20	v (mVs^{-1})	2 - 40	5
ΔE_s (mV)	1 - 25	1	t_p (ms)	2 - 100	10

A Figura 5 apresenta os voltamogramas de SWV e DPV com os melhores valores de cada parâmetro.

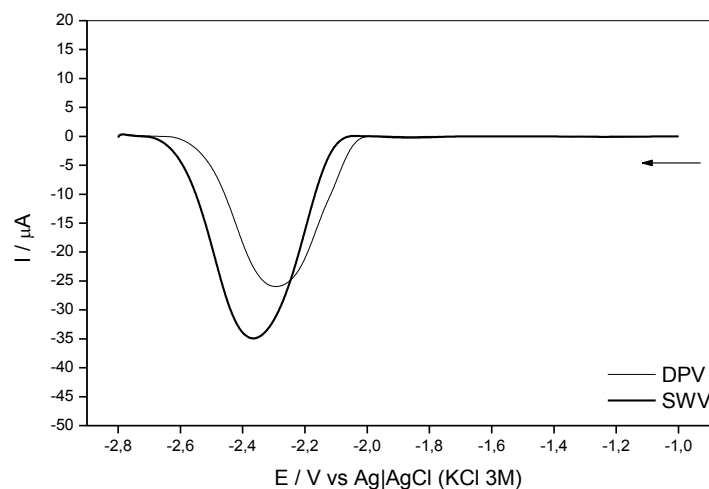


Figura 5 Voltamogramas de comparação da solução de acrilamida entre as técnicas SWV e DPV

Verifica-se na Tabela 1 e na Figura 5, que as técnicas DPV e SWV podem ser usadas na identificação e posterior quantificação de acrilamida em DMF. No entanto, optou-se pela SWV para a quantificação da acrilamida, pois esta técnica apresentou melhores resultados experimentais durante o estudo dos parâmetros.

3.4 Análise do desempenho do método

3.4.1 Curva analítica

A curva analítica para a técnica SWV (Figura 6) foi construída no intervalo de concentração de 100 a 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ em uma solução de 0,1 mmol L^{-1} de TBATFB em DMF. Os pontos de I_p equivalem a média de três medidas realizadas com um mesmo eletrodo, após a renovação mecânica por meio do polimento do eletrodo com alumina, antes de cada medida.

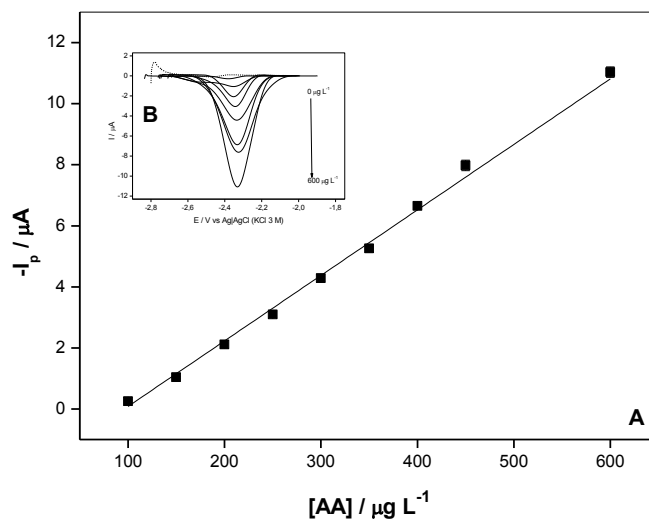


Figura 6 Curva analítica obtida para acrilamida em DMF (A). Valores de I_p obtidos a partir dos voltamogramas apresentados (B)

O limite de detecção (LD) é a menor concentração da substância analisada que pode ser detectada, e o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração da substância analisada que pode ser quantificada. Ambas foram calculadas de acordo com as recomendações da IUPAC, conforme a equações (I) e (II), respectivamente (RIBANI et al., 2004; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

$$LD = \frac{3,3 \times SD}{B} \quad (\text{I})$$

$$LQ = \frac{10 \times SD}{B} \quad (\text{II})$$

Em que SD equivale ao desvio padrão da média do sinal de 12 medidas do branco no potencial de pico (E_p) de redução da acrilamida, e o B o coeficiente angular da curva analítica.

Na Tabela 2 estão apresentados a equação da reta referente à curva analítica, o coeficiente de correlação linear, o limite de detecção e a quantificação e a sensibilidade da acrilamida.

Tabela 2 Resultados experimentais da regressão linear e testes analíticos da curva analítica utilizando a técnica SWV

Equação da reta	$I_p (\mu A) = -2,06521 + 0,02149 [AA] (\mu g L^{-1})$
R^2	0,993
LD ($\mu g L^{-1}$)	29,47
LQ ($\mu g L^{-1}$)	98,22

n = 12

O LD encontrado está de acordo com outros autores como Niaz et al. (2008) e Veselá e Šucman (2013), que encontraram um LD de 13,92 e 27 $\mu g L^{-1}$, respectivamente. O primeiro utilizou a voltametria de redissolução adsortiva, e o segundo a polarografia de pulso diferencial.

Para a avaliação da repetibilidade do método proposto, avaliou-se 12 medidas sucessivas em SWV de 1 $mg L^{-1}$ de AA em 0,1 mM de TBATFB/DMF, obtendo uma média de $18 \pm 0,4 \mu g L^{-1}$ e RSD de 2,23%. Avaliou-se também a precisão intermediária a partir de 12 medidas realizadas em 4 dias diferentes em SWV de 1 $mg L^{-1}$ de AA em 0,1 mM de TBATFB/DMF tendo como média $17 \pm 0,52 \mu g L^{-1}$ e RSD de 3,13 %.

3.4.2 Estudo da especificidade

A especificidade do método proposto foi verificada por meio do estudo de possíveis interferentes como Ca^{2+} e K^+ , que estão presentes na cultura da batata, e o Na^+ é adicionado após o processamento da batata. Analisou-se uma solução de $200 \mu\text{gL}^{-1}$ de AA em $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de TBATFB/DMF contendo diferentes concentrações de cada interferente. O efeito de cada interferente no sinal analítico da AA está ilustrado na Tabela 3, demonstrando que todos os valores obtidos são inferiores a 5%. Verifica-se que ao aumentar a concentração dos cátions há uma mudança maior no valor de I_p da AA. No entanto, o método proposto mostrou-se eficaz na determinação de baixas concentrações do analito na presença de concentrações elevadas dos interferentes, principalmente o Na^+ , que está presente em altas concentrações, em amostras reais de batatas palha e chips.

Tabela 3 Influência de interferentes no valor de I_p da AA

Interferente	Concentração dos interferentes (mgL^{-1})	Mudança de I_p da AA (μA)	%
Ca^{2+}	0,1	0,021	0,98
	0,2	0,048	2,43
	5	-0,082	3,83
Na^+	0,1	-0,025	1,17
	0,2	0,011	0,51
	5	-0,097	4,53
K^+	0,1	-0,053	2,48
	0,2	-0,029	1,36
	5	-0,061	2,94

3.4.3 Análise das amostras

A fim de avaliar a aplicabilidade do método proposto analisou-se a presença de AA em amostras de batatas frita e chips, e biscoito, adquiridos no comércio local. A concentração de AA em cada amostra foi determinada pelo método de adição de padrão e está apresentado na Tabela 4. Adicionou-se às amostras concentrações conhecidas de AA, e fez-se então, sucessivas adições de AA, obtendo assim, o valor de recuperação de cada amostra (Tabela 4). As recuperações variaram de 94,2 a 104,8% para as amostras de batatas palha, de 94,7 a 106,2% para as amostras de batata chips, e de 105,2 a 108,3% para as amostras de biscoito. Os valores apresentados na Tabela 4 apresentaram valores de RSD inferiores a 5%. As recuperações encontradas mostraram-se satisfatórias, tanto para as amostras de batata, quanto para a amostra de biscoito, evidenciando assim, a precisão do método.

Tabela 4 Concentração de AA em batatas e biscoito

	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Detectado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Batata palha			
Amostra 1	0	192,9	-
	100	297,7	104,8
	300	491,1	99,4
	600	818,1	103,0
Amostra 2	0	569,3	-
	100	663,5	94,2
	300	871,3	100,7
	600	1180,6	101,9
Batata Chips			
Amostra 3	0	442,4	-
	100	548,6	106,2
	300	755,4	104,3
	600	1010,7	94,7
Biscoito			
Amostra 4	0	104,8	-
	100	213,1	108,3
	300	420,3	105,2
	600	739,0	105,7

4 CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida para determinação de AA em solução de TBATFB/DMF, mostrou-se rápida e precisa, oferecendo boa sensibilidade e seletividade. A faixa linear alcançada por este método foi de 100 a 600 $\mu\text{g L}^{-1}$, obtendo-se um LD e LQ 29,47 e 98,22 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os íons interferentes não comprometeram a determinação de AA quando o método de adição de padrão foi empregado. O método proposto apresentou boa reprodutibilidade e repetibilidade, envolvendo aparelhos simples e de baixo custo. Além disso, os resultados obtidos durante a análise de AA em amostras de batatas e biscoito, demonstraram potencial de aplicabilidade do método em amostras reais.

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF ACRYLAMIDE IN FOOD

ABSTRACT

The glassy carbon electrode (GCE) was used for determination of Acrylamide (AA) by a simple and sensitive method. In a solution of tetrabutylammonium tetrafluoroborate (TBATFB) 0.1 mol L^{-1} prepared in dimethylformamide (DMF) the AA was presented a defined cathodic peak in -2.3 V in the potencial range of -1 to -2.7 V . The technique was used for the quantification of AA was the square wave voltammetry (SWV) and optimized conditions. The peak current was linear in the concentration range of $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ to $600 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ with correlation coefficient of $R^2 = 0.993$. The method showed a great reproducibility with RSD 2.23% ($n = 12$). The limit of detection (LD) and quantitation (LOQ) was 27.47 and $98.22 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The method was successfully applied for the quantification of AA in potato samples, "flash" chip, chips and cookies without any interference effect of the alkali metals.

Keywords: Potato. Cookies. SWV.

REFERÊNCIAS

- AGUAS, P. C. et al. Analysis of acrylamide in coffee and cocoa by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 385, n. 8, p. 1526-1531, Aug. 2006.
- ALBISHRI, H. M.; EL-HADY, D. A. Eco-friendly ionic liquid based ultrasonic assisted selective extraction coupled with a simple liquid chromatography for there liable determination of acrylamide in food samples. **Talanta**, London, v. 118, p. 129-136, Jan. 2014.
- ALVES, R. C. et al. Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length. **Food Chemistry**, Oxford, v. 119, n. 3, p. 929-934, Apr. 2010.
- ANESE, M. et al. Effect of vacuum roasting on acrylamide formation and reduction in coffee beans. **Food Chemistry**, Oxford, v. 145, p. 168-172, Feb. 2014.
- ARISSETO, A. P.; TOLEDO, M. C. F. Estimativa preliminar da ingestão de acrilamida no Brasil. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 9-14, 2008.
- BACKE, W. J.; YINGLING, V.; JOHNSON, T. The determination of acrylamide in environmental and drinking waters by large-volume injection: hydrophilic-interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1334, p. 72-78, Mar. 2014.
- BERGMARK, E. Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 10, n. 1, p. 78-84, 1997.
- CASADO, F. J.; SÁNCHEZ, A. H.; MONTAÑO, A. Reduction of acrylamide content of ripe olives by selected additives. **Food Chemistry**, Oxford, v. 119, n. 1, p. 161-166, Mar. 2010.

GONZÁLEZ-FUENTES, F. J. et al. Electrochemical analysis of acrylamide using screen-printed carboxylated single-walled carbon nanotube electrodes. **Electroanalysis**, New York, v. 26, n. 5, p. 1039-1044, May 2014.

HAGMAR, I. et al. Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, Stockholm, v. 27, n. 4, p. 219-226, 2001.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER.
Acrylamide monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some industrial chemicals. Lyon, 1994. 569 p. (Some Industrial Chemicals, 60).

ISLEROGLU, H. et al. Effect of steam baking on acrylamide formation and browning kinetics of cookies. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 77, n. 10, p. 257-263, 2012.

KIM, T. et al. Determination of acrylamide and glycidamide in various biological matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. **Talanta**, London, v. 131, p. 46-54, Jan. 2015.

KRAJEWSKA, A.; RADECKI, J.; RADECKA, H. A voltammetric biosensor based on glassy carbon electrodes modified with single-walled carbon nanotubes/hemoglobin for detection of acrylamide in water extracts from potato crisps. **Sensors**, New York, v. 8, n. 9, p. 5832-5844, Sept. 2008.

LAUZURICA, L. Z.; FAYOS, J. G. Acrilamida en patatas fritas y productos de aperitivo elaborados en la Comunidad Valenciana. **Gaceta Sanitaria**, Barcelona, v. 21, n. 4, p. 334-337, 2007.

LIU, C. et al. Fluorescence determination of acrylamide in heat-processed foods. **Talanta**, London, v. 123, p. 95-100, June 2014.

LU, H.; ZHENG, H. Fractal colour: a new approach for evaluation of acrylamide contents in biscuits. **Food Chemistry**, Oxford, v. 134, n. 4, p. 2521-2525, Oct. 2012.

MICHALAK, J.; GUJSKA, E.; KLEPACKA, J. The effect of domestic preparation of some potato products on acrylamide content. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 66, n. 4, p. 307-312, Nov. 2011.

MORALES, G. et al. Effect of natural extracts on the formation of acrylamide in fried potatoes. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 58, n. 2, p. 587-593, Oct. 2014.

NIAZ, A. et al. A new simple sensitive differential pulse polarographic method for the determination of acrylamide in aqueous solution. **Talanta**, London, v. 74, n. 5, p. 1608-1614, Feb. 2008.

PÄIVIÖ, J.; WALLENTINUS, H. G. **The Hallandsås railway tunnel project**. Stockholm: EIA, 2001. Disponível em: <http://www.nordregio.se/global/publications/publications%202001/r2001_6/r0106_p55.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2015.

PASTORIZA, S.; RUFÍAN-HENARES, J.; MORALES, F. J. Reactivity of acrylamide with coffee melanoidins in model systems. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 45, n. 2, p. 198-203, Mar. 2012.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 771-780, mar./abr. 2004.

STOBIECKA, A.; RADECKA, H.; RADECKI, J. Novel voltammetric biosensor for determining acrylamide in food samples. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 22, n. 9/10, p. 2165-2170, Apr. 2007.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1278-1287, maio 2009.

VESELÁ, H.; ŠUCMAN, E. Determination of Acrylamide in food using adsorption stripping voltammetry. **Czech Journal of Food Sciences**, Prague, v. 31, n. 4, p. 401-406, 2013.

VIKSTRÖM, A. C. et al. In vivo doses of acrylamide and glycidamide in humans after intake of acrylamide-rich food. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 119, n. 1, p. 41-49, 2011.

VIVANTI, V.; FINOTTI, E.; FRIEDMAN, M. Level of Acrylamide precursors asparagine, fructose, glucose, and sucrose in potatoes sold at retail in Italy and in the United States. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 2, p. C81-C85, Mar. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food and Drug Administration. Health implications of acrylamide in food. In: _____. **Report of a joint FAO/WHO consultation**. Geneva, 2002. p. 1-39.

ZARGAR, B.; SAHRAIE, N. R.; KHOSHNAMEH, F. Catalytic square-wave voltammetric determination of acrylamide in potato chips. **Analytical Letters**, New York, v. 42, n. 10, p. 1407-1417, 2009.

ZHANG, G. et al. Acrylamide formation in almonds (*Prunus dulcis*): influences of roasting time and temperature, precursors, varietal selection, and storage. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 15, p. 8225-8232, Aug. 2011.

ZHANG, Y. et al. Determination of acrylamide in Chinese traditional carbohydrate-rich foods using gas chromatography with micro-electron capture detector and isotope dilution liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 584, n. 2, p. 322-332, Feb. 2007a.

ZHANG, Y. et al. An improved method validation for rapid determination of acrylamide in foods by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1142, n. 2, p. 194-198, Feb. 2007b.

**ARTIGO 2 Desenvolvimento de uma metodologia eletroquímica para
determinação de acrilamida em alimentos usando um eletrodo
de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio**

Elisângela de Fátima Lisboa Tavares²

Rafael Machado Félix de Lima

Adelir Aparecida Saczk

Leonardo Luiz Okumura

Marcelo Firmino de Oliveira

Zuy Maria Magriotis

Artigo normalizado conforme a NBR 6022 (ABNT, 2003).

² Doutorado em Agroquímica pela Universidade Federal de Lavras
tavareslisboa@yahoo.com.br

RESUMO

Um novo método voltamétrico através da modificação do eletrodo de carbono vítreo (GCE) com filme de mercúrio foi estudado para a determinação de Acrilamida (AA) em solução aquosa. A acrilamida apresentou um pico catódico bem definido em -2,3 V. Após o estudo de eletrólitos de suporte, a AA apresentou a melhor resposta na presença KCl 0,1 mol L⁻¹. A corrente de pico mostrou-se linear na faixa de concentração de 80 a 800 µg L⁻¹ com coeficiente de correlação R² = 0,997, após as condições experimentais serem estudadas para a voltametria de onda quadrada (SWV). O limite de detecção e quantificação encontrado foi de 24,4 e 81,3 µg L⁻¹, respectivamente. O método foi aplicado na quantificação de AA em amostras de biscoitos e torradas, e os resultados obtidos demonstraram potencial de aplicabilidade do método em amostras reais.

Palavras-chave: Biscoitos. Torrada. Voltametria de onda quadrada.

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 50, a acrilamida vem sendo produzida comercialmente pela indústria, a partir da hidratação da acrilonitrila. Esta reação leva à formação de poliacrilamidas, que são usadas na produção de géis para eletroforese e para clarificar e purificar água potável e esgoto. A acrilamida também é usada na construção de fundações para barragens e túneis (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2002).

A acrilamida pode ser formada naturalmente quando alimentos ricos em carboidratos são submetidos a elevadas temperaturas, sendo sua principal via de formação a reação da carbonila de um açúcar redutor com um aminoácido livre, principalmente asparagina. Os produtos a base de batata e de panificação representam cerca de 50% e 20% da exposição humana à acrilamida, respectivamente (ERIKSSON, 2005; KERAMAT et al., 2011; VINCI; MESTDAGH; MEULENAER, 2012).

A International Agency for Research on Cancer - IARC (1994) classificou a acrilamida como possível carcinógeno humano. Estudos com animais mostraram que a acrilamida é rapidamente absorvida por todas as vias de exposição, sendo mais rápida por via oral. Após a exposição à acrilamida, esta é oxidada por citocromo P450, formando a glicidamida, que por sua vez, assume o potencial genotóxico. Há indícios de que a glicidamida forma adutos estáveis com o DNA, podendo enfim, desencadear a iniciação do processo mutagênico e cancerígeno. A acrilamida e a glicidamida podem se ligar à hemoglobina e enzimas, e assim, ser distribuídas por todos os tecidos do corpo (CAPUANO;

FOGLIANO, 2011; DOERGE et al., 2005; ERKEKOGLU; BAYDAR, 2014; WHO, 2002).

As técnicas analíticas mais utilizadas para determinação de acrilamida são cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), e cromatografia gasosa (GC). Albishri e El-Hady (2014) determinaram acrilamida em bata frita e pão por HPLC acoplado a um detector UV obtendo um limite de detecção (LD) de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. A cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILC) foi usada para determinar acrilamida em água por Backe, Yingling e Johnson (2014) alcançando um LD de 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Michalak, Gujska e Klepacka (2013) tiveram um LD de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ na determinação de acrilamida em comida de bebê por HPLC acoplado ao detector de arranjos diodos (DAD) com fase reversa (RP). A espectrometria de massa (MS) acoplada ao HPLC no modo MS-MS foi usado para determinação de acrilamida em plasma e urina por Kim et al. (2015), em pão por Nielsen et al. (2006) obtendo um LD de 13 μgkg^{-1} , em cacau e comida de bebê por Hoenicke et al. (2004) com LD de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, Arisseto et al. (2007) com LD de 10 μgkg^{-1} . A acrilamida e seus percussores foram determinados por Liu et al. (2013) em batata frita, frango frito e biscoito, utilizando HPLC/MS-MS com LD para a Acrilamida de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Omar, Ibrahim e Elbashir (2014) tiveram um LD de 9,3 μgkg^{-1} na determinação de acrilamida em batata e berigela fritas, e grão de bico por GC/MS-MS. A acrilamida foi determinada em cacau e comida de bebê por Hoenicke et al. (2004) através da GC/MS-MS, alcançando um LD de 1,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Outras técnicas também têm sido estudadas para a determinação de acrilamida, como a fluorescência (FLD), que foi utilizada por Liu et al.

(2014), obtendo um LD de 0,015 mgL⁻¹. A polarografia foi aplicada para determinar acrilamida por Niaz et al. (2008), Veselá e Šucman (2013) e Zargar, Sahraie e Khoshnam (2009); com LD de 3,52 µg L⁻¹, 27 µg L⁻¹ e 12 µg kg⁻¹, respectivamente. Stobiecka, Radecka e Radecki (2007) determinaram acrilamida por voltametria de onda quadrada (SWV) com LD de 0,12 nmol L⁻¹.

As técnicas eletroquímicas têm se mostrado muito versáteis na determinação de acrilamida em diversas matrizes, pois, permite uma análise rápida, precisa, e em loco, e ainda podendo ter sua sensibilidade e seletividade aumentada através da modificação química dos eletrodos. Diante disso, este trabalho tem como objetivo propor um método voltamétrico quantitativo para determinação de acrilamida em alimentos, usando eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes

Todos os reagentes químicos eram de grau analítico e foram utilizados sem purificação adicional. Foram preparadas soluções estoque (1000 mg L^{-1}) de acrilamida (Sigma 99%) aquosa e em dimetilformamida (Synth 99,8%). As diluições foram feitas por meio da transferência de alíquotas quantitativas da solução estoque para um balão volumétrico de 10,0 mL e completando-se o volume.

As soluções de eletrólitos de suporte foram preparadas utilizando-se os seguintes reagentes: NaOH (99,0%) e KCl (97,0%) adquiridos da Synth (Brasil); KOH (85,0%), LiCl (99,0%), CrCl₃ (97,0%), KNO₃ (99,0%), NH₄Cl (99,5%), HCl (36,5%) e HNO₃ (65%) adquiridos da Vetec (Brasil); solução tampão carbonato (pH 10), dimetilformamida e tetrabutilamônio tetrafluoroborato (TBATFB) com pureza de 95,0% adquiridos da Acros Organics (Bélgica).

2.2 Medidas voltamétricas

As medidas voltamétricas foram realizadas em um equipamento potenciostato N Autolab PGSTAT 128 (Eco-Chemie, Utrecht, Holanda), (Eco-Chemie, Utrecht, Países Baixos) em interface com um microcomputador. O software General Purpose Electrochemical System (GPES) (Versão 4.9) foi usado para a aquisição de dados. Foram usados os eletrodos de carbono vítreo (GCE) modificado com filme de mercúrio

(Hg), com área geométrica de $0,0314 \text{ cm}^2$ (trabalho), um fio de Pt (auxiliar) e Ag|AgCl (KCl_{sat}) (referência). Todos os eletrodos foram adquiridos da Metrohm (Suíça). A superfície do eletrodo foi renovada a cada aproximadamente 30 medidas, e a cada 5 medidas, o eletrodo foi lavado com água.

2.3 Preparo do eletrodo modificado com filme de mercúrio - EFHg

O EFHg foi preparado a partir de uma modificação da metodologia descrita por Oliveira et al. (2004). A deposição eletroquímica do filme de mercúrio foi realizada adicionando-se $500 \mu\text{L}$ de solução padrão de Hg(II) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ diluída a um volume final de 10 mL de solução de LiCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Após a desaeração da solução com N_2 durante 15 minutos para remoção do oxigênio molecular, aplicou-se um potencial de $-0,9 \text{ V}$ por 20 minutos ao EFHg. Após formação do filme, o eletrodo foi lavado com água deionizada e deixado em solução do eletrólito de suporte, até a realização das medidas eletroquímicas.

2.4 Detecção voltamétrica da acrilamida

A voltametria de pulso diferencial (DPV) e onda quadrada (SWV) foram aplicadas para a acrilamida como métodos de detecção. Os parâmetros voltamétricos foram otimizados, e a curva analítica foi construída por adição de alíquotas de acrilamida na célula contendo a solução de eletrólito de suporte, para obter as concentrações que variam $80 - 800 \mu\text{g L}^{-1}$. A curva analítica foi obtida através de regressão linear,

dados de ajuste mínimos quadrados, traçando um gráfico de corrente de pico *versus* a concentração de acrilamida. Ao estudar a precisão (reprodutibilidade e repetibilidade) dos métodos eletroanalíticos e verificar a interferentes, foram realizados experimentos de recuperação utilizando-se amostras comerciais de biscoitos e torradas.

2.5 Preparo das amostras

As amostras de biscoitos e torradas foram preparadas a partir de uma adaptação de Zargar, Sahraie e Khoshnam (2009). Cada amostra foi macerada com almofariz empregando-se um pistilo e armazenada em frasco fechado. Pesou-se 2 g da amostra em um tubo de ensaio e adicionou-se 40 mL de DMF deixando no ultrassom por 10 minutos. Após, este extrato foi centrifugado por 10 minutos a uma rotação de 4000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desengordurado com hexano, e 10 mL do extrato foram evaporados até a *secura*. Em seguida, 5 mL de água foi adicionado com agitação constante para dissolver todo o resíduo, posteriormente, efetuou-se a análise voltamétrica.

3 RESULTADOS

3.1 Eletrólito de suporte

Na investigação da redução da acrilamida AA aplicou-se a técnica SWV, estudando os parâmetros, frequência, amplitude e incremento de varredura, na presença de diversos eletrólitos suporte: KOH, NaNO₃, KNO₃, HCl, LiCl, NaCl e KCl, em meio aquoso e TBATFB em DMF, todos na concentração de 0,1 mol L⁻¹. A faixa de potencial estudada foi de -1 a -2,8 V, observando picos de redução de AA bem definidos em todos os eletrólitos (Figura 1A). A maior I_p foi obtida pelo eletrólito KCl (H) em -2,3 V. Estes resultados também indicam que há uma influência significativa do tipo de eletrólito na redução da AA. Segundo Niaz et al. (2008), o eletrólito de suporte altera a estrutura da dupla camada na interface da solução com o eletrodo. O eletrólito KCl foi o que apresentou uma melhor resposta voltamétrica, com picos bem definidos, maior I_p e com E_p menos negativos (Figura 1B). Portanto, o KCl foi o eletrólito de suporte escolhido para as medidas subsequentes.

O efeito da concentração de KCl na I_p de AA também foi estudado, como mostra a Figura 2. Observa-se nesta figura que há um pequeno aumento de I_p entre as concentrações de 0,001 a 0,1 mol L⁻¹, no entanto, há também um deslocamento do potencial de pico para valores menos negativos. A partir da concentração de 0,1 mol L⁻¹ a I_p ficou praticamente constante. Diante disso, a concentração de KCl escolhida para os estudos posteriores foi de 0,1 mol L⁻¹.

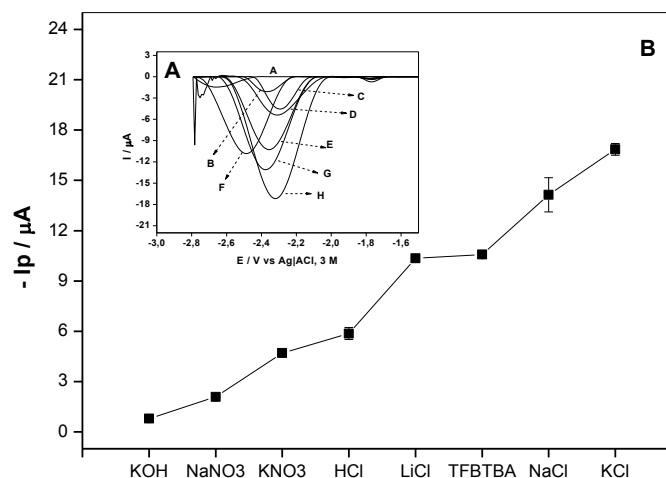


Figura 1 Efeito do eletrólito de suporte na corrente de pico de 1 mg L^{-1} de AA. KOH (A), NaNO₃ (B), KNO₃ (C), HCl (D), LiCl (E), TBATFB (F), NaCl (G) e KCl (H)

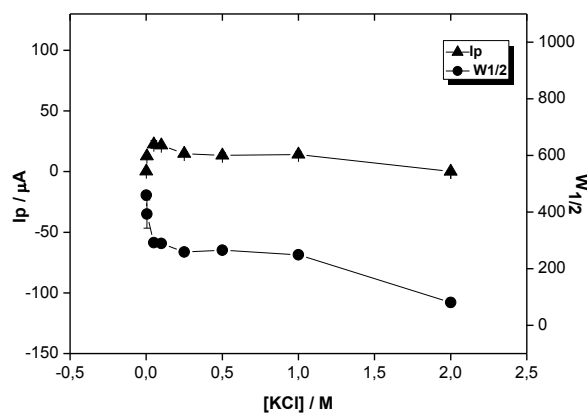


Figura 2 Efeito da concentração de KCl na corrente de pico de 1 mg L^{-1} de AA

3.2 Caracterização voltamétrica da acrilamida

3.2.1 Comportamento voltamétrico da acrilamida no modo redução

O comportamento voltamétrico da acrilamida foi investigado por voltametria cíclica em um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de mercúrio por meio da redução eletroquímica desta em meio aquoso de uma solução $71,08 \text{ mg L}^{-1}$ de AA em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Deste modo, o comportamento eletroquímico da acrilamida foi estudado no intervalo de potenciais de -1 a -3 V com velocidade de 60 mV s^{-1} , verificando-se a presença de um pico catódico referente à redução do composto ($E_p = -2.3 \text{ V vs Ag|AgCl, KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$), e ausência de pico anódico na varredura reversa de potencial, indicando uma irreversibilidade da natureza da reação do eletrodo. (Figura 3). Esta irreversibilidade foi confirmada pelo deslocamento do E_p com o aumento da velocidade de varredura (v) e pela não linearidade entre $I_p \times v$.

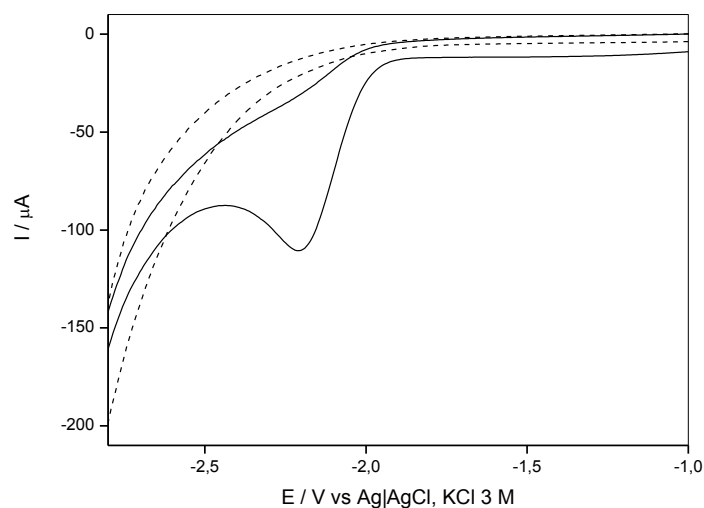


Figura 3 Voltamogramas cíclicos registrados KCl 0,1 M na (...) ausência e na (—) presença de 1 mmol L^{-1} ($71,08 \text{ mgL}^{-1}$) de acrilamida sob eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio ($v = 60 \text{ mV s}^{-1}$)

A natureza do transporte de massa no processo redox da AA também pode ser indicada pela relação $I_p \times v$. A não linearidade de $I_p \times v$ mostra que o transporte de massa é controlado por difusão das espécies na superfície do eletrodo, o que é confirmado pelo coeficiente angular da relação $\log I_p \times \log v$ que é de 0,43. De acordo com a literatura, valores de coeficiente angular igual a 0,5 referem-se a processos controlados por difusão, já os controlados por adsorção, o coeficiente angular aproxima-se de 1 (GOSSER JÚNIOR, 1993).

3.3 Condições experimentais

Para o estudo das melhores condições experimentais das técnicas SWV e DPV utilizou-se uma solução de AA 2 mg L^{-1} em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl. Para a técnica de SWV avaliou-se os parâmetros: amplitude (ΔE), frequência (f) e incremento de varredura (ΔE_s), e para a técnica de DPV avaliou-se os parâmetros: amplitude (ΔE), velocidade (v) e tempo de pulso (t_p) (Tabela 1).

Tabela 1 Avaliação dos parâmetros para determinação de acrilamida em solução de KCl

Voltametria de onda quadrada			Voltametria de pulso diferencial		
Parâmetro	Intervalo	Melhor sinal	Parâmetro	Intervalo	Melhor sinal
ΔE (mV)	10 - 150	100	ΔE (mV)	10 - 150	150
f (Hz)	10 - 150	100	v (mVs^{-1})	5 - 100	30
ΔE_s (mV)	1 - 15	15	t_p (ms)	2 - 20	5

A Figura 4 apresenta os voltamogramas de SWV e DPV com os melhores valores de cada parâmetro.

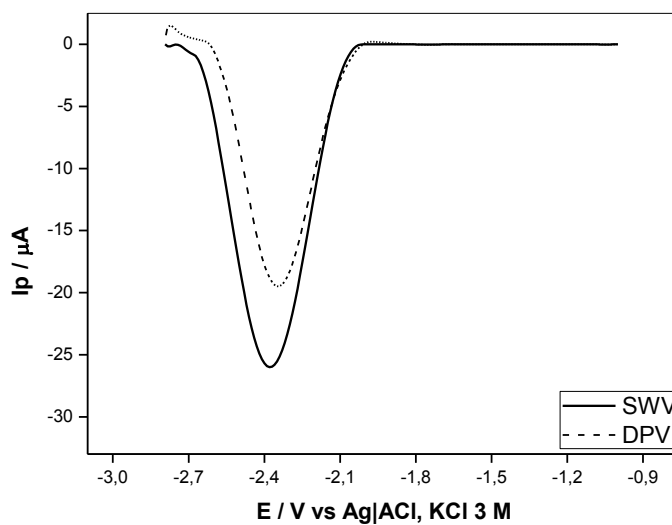


Figura 4 Voltamogramas de comparação entre as técnicas SWV e DPV para uma solução de AA 2 mg L^{-1} em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl

Verifica-se na Tabela 1 e na Figura 4, que as duas técnicas podem ser usadas na identificação e posterior quantificação de acrilamida. No entanto, optou-se pela SWV para a quantificação da acrilamida, pois esta técnica apresentou melhores resultados experimentais como maior I_p , e por ser uma técnica de pulso mais rápida.

3.3.1 Mecanismo de redução da acrilamida

Utilizando os resultados do voltamograma obtido para a redução da AA em solução aquosa de KCl (Figura 3), foi calculado o número de elétrons envolvidos no processo irreversível utilizando-se a equação $|E_p - E_{p/2}| = 1,1RT/\alpha nF$ (BARD; FAULKNER, 2001), sendo E_p e $E_{p/2}$ o

potencial de redução e potencial de meia onda, respectivamente, obtendo um valor de αn igual a 1,11, (sendo $E_p = 221,6$ mV; $E_p/2 = 224,3$ mV; $R = 8,314$ J K⁻¹ mol⁻¹; $T = 298$ K; e $F = 96480$ C). Segundo a literatura, para processos irreversíveis α é igual a 0,5 (LI, 2007). Sendo assim, o número de elétrons envolvidos na redução da AA foi 2, o que está de acordo com o mecanismo proposto por Niaz et al. (2008) (Figura 5) na qual usou um eletrodo de mercúrio. A acrilamida perde dois elétrons formando um diânion, que é estabilizado por próton, gerando apenas uma onda catódica. A forma ceto é favorecida em relação a forma enol (menos estável). Este mecanismo sugere um equilíbrio entre a acrilamida e a propanamida.

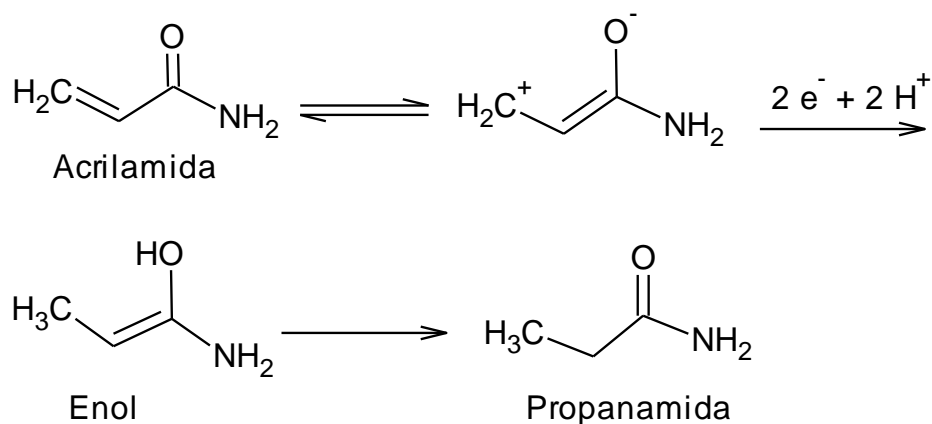


Figura 5 Mecanismo proposto para a redução da acrilamida em eletrodo de carbono vítreo vs. Ag/AgCl

3.4 Análise do desempenho do método

3.4.1 Curva analítica

A curva analítica para a técnica SWV foi construída no intervalo de concentração que variaram de 80 a 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ numa solução aquosa de 0,1 mmol L^{-1} de KCl, e estão representadas na Figura 6A e B. Os pontos de I_p equivalem a média de três medidas realizadas com um mesmo eletrodo.

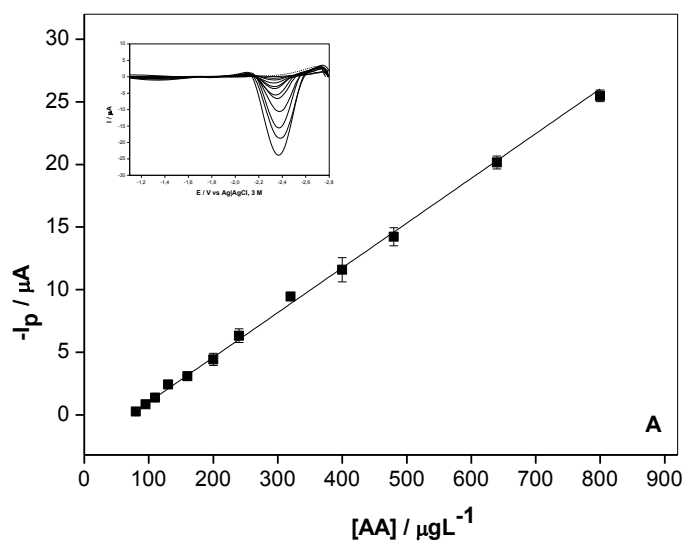


Figura 6 Curva analítica obtida para acrilamida em KCl (A). Valores de I_p obtidos a partir dos voltamogramas apresentados em B

O limite de detecção (LD) é a menor concentração da substância analisada que pode ser detectada, e o limite de quantificação (LQ) é a

menor concentração da substância analisada que pode ser quantificada. Ambas foram calculadas de acordo com as recomendações da IUPAC (RIBANI et al., 2004; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009), utilizando-se as equações $LD = 3,3 \times SD/B$ e $LQ = 10 \times SD/B$, onde SD equivale ao desvio padrão da média do sinal de 12 medidas do branco no potencial de pico (E_p) de redução da acrilamida, e o B, o coeficiente angular da curva analítica.

Na Tabela 2 são apresentados a equação da reta referente a curva analítica, o coeficiente de correlação linear, o limite de detecção e a quantificação, e a sensibilidade da acrilamida.

Tabela 2 Resultados experimentais da regressão linear e testes analíticos da curva analítica utilizando a técnica SWV

Equação da reta	$I_p (A) = 2,555 \times 10^{-6} + 3,574 \times 10^{-8} [AA] (\mu\text{g L}^{-1})$
R²	0,997
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	24,4
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	81,3
* n = 12	

O LD encontrado está de acordo com outros autores, como Niaz et al. (2008) e Veselá e Šucman (2013), que encontraram um LD de 13,92 e 27 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O primeiro utilizou a voltametria de redissolução adsortiva e o segundo a polarografia de pulso diferencial.

A precisão intermediária foi avaliada a partir da realização de 12 medidas em 4 dias diferentes em SWV de 1 mgL^{-1} de AA em 0,1 mol L^{-1} de KCl, tendo com média de $48,4 \pm 1,73 \mu\text{A}$ e RSD de 3,57%. Avaliou-se

também a repetibilidade do método proposto a partir de 12 medidas sucessivas em SWV de 1 mg L^{-1} de AA em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, obtendo-se uma média de $49,6 \pm 0,76 \text{ } \mu\text{A}$ e RSD de 1,53%.

3.4.2 Estudo da especificidade

Para estudar a especificidade do método, analisou-se o efeito dos interferentes por meio de medidas de três amostras (1 - biscoito doce, 2 - biscoito integral salgado e 3 - torrada integral salgada) adquiridas no comércio local. Na figura 7 são apresentadas as curvas analíticas obtidas para cada amostra, e com o padrão utilizando o eletrodo EFHg no intervalo de 250 a $400 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados de regressão linear obtidos para a AA, nas diferentes amostras, e também os valores de limite de detecção, que foram calculados utilizando-se os mesmos critérios aplicados aos resultados obtidos com o padrão, encontram-se na Tabela 3.

Verifica-se na Tabela 3 que há um aumento da concentração de AA na célula eletroquímica, quando o método é aplicado nas amostras. Isso se deve à presença do analito nas amostras analisadas. Outro fator a ser destacado na Tabela 3, é o aumento do limite de detecção das amostras em relação a curva do padrão, e este se torna mais acentuado nas amostras salgadas. Isso ocorre possivelmente devido ao aumento do teor de Na^+ nas amostras, no entanto, isso não interfere significativamente nas análises quando o método de adição de padrão é aplicado.

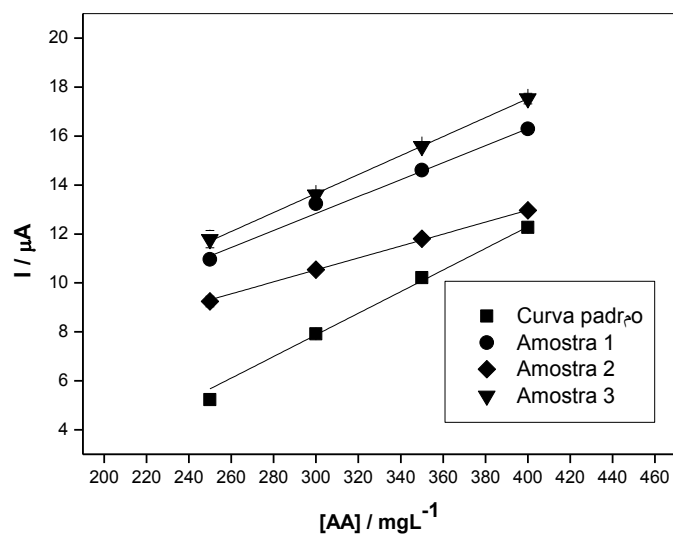


Figura 7 Curvas analíticas obtidas para AA em diferentes amostras, com $f = 100 \text{ Hz}$, $\Delta E = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 15 \text{ mV}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ molL}^{-1}$. Padrão (■), amostra 1 (●), amostra 2 (◆) e amostra 3 (▼)

Tabela 3 Resultados de regressão linear das curvas analíticas da AA, obtidos para padrão e amostras, utilizando o eletrodo de carbono vítreo modificado com EFHg

Amostra	Regressão	LD ($\mu\text{g}^{\text{L}^{-1}}$) ¹⁾	R
Padrão	$I_p \text{ (A)} = 5,370 \times 10^{-6} - 6,237 \times 10^{-8} [\text{AA}] \text{ (}\mu\text{g}^{\text{L}^{-1}}\text{)}$	40,06	0,999
Amostra 1	$I_p \text{ (A)} = -2,446 \times 10^{-6} - 3,463 \times 10^{-8} [\text{AA}] \text{ (}\mu\text{g}^{\text{L}^{-1}}\text{)}$	49,8	0,998
Amostra 2	$I_p \text{ (A)} = -3,215 \times 10^{-6} - 2,439 \times 10^{-8} [\text{AA}] \text{ (}\mu\text{g}^{\text{L}^{-1}}\text{)}$	59,7	0,999
Amostra 3	$I_p \text{ (A)} = -2,018 \times 10^{-6} - 3,877 \times 10^{-8} [\text{AA}] \text{ (}\mu\text{g}^{\text{L}^{-1}}\text{)}$	72,3	0,999

3.4.3 Análise das amostras

A fim de avaliar a aplicabilidade do método proposto, analisou-se a presença de AA em amostras de biscoito doce e integral salgado, e torrada integral salgada, adquiridas no comércio local. A concentração de AA em cada amostra foi determinada pelo método de adição de padrão e está apresentada na Tabela 4. Foram adicionadas às amostras, concentrações conhecidas de AA, e foram realizadas sucessivas adições de AA, obtendo-se o valor de recuperação de cada amostra (Tabela 4). As recuperações variaram de 99,89 a 106,9% para a amostra de biscoito doce, de 103,7 a 105,5% para a amostra de biscoito integral salgado, e de 98,32 a 101,7% para a amostra de torrada integral salgada. Os valores apresentados na Tabela 4 apresentaram valores de RSD inferiores a 5%.

As recuperações encontradas mostraram-se satisfatórias para todas as amostras, evidenciando assim, a precisão do método.

Tabela 4 Concentração de AA em biscoitos e torrada

	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Detectado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Biscoito doce	0	96,5	
	95	191,4	99,89
	200	363,8	106,9
	640	741,5	100,7
Biscoito integral salgado	0	147,1	
	95	246,6	104,7
	200	358,2	105,5
	640	810,9	103,7
Torrada integral salgada	0	110,1	
	95	203,5	98,32
	200	308,5	99,00
	640	761,1	101,7

4 CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio para determinação de AA em solução de KCl, apresentou-se precisa e rápida, oferecendo boa sensibilidade e seletividade. Os LD e LQ encontrados foram 24,4 e 81,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para uma faixa linear de 80 a 800 $\mu\text{g L}^{-1}$. O método proposto apresentou boa reprodutibilidade e repetibilidade, envolvendo aparelhos simples e de baixo custo. Além disso, os resultados obtidos durante a análise de AA em amostras de biscoitos e torradas, demonstrou potencial de aplicabilidade do método em amostras reais.

**DEVELOPMENT OF AN ELECTROCHEMICAL
METHODOLOGY FOR DETERMINATION OF ACRYLAMIDE
IN FOOD USING A GLASSY CARBON ELECTRODE MODIFIED
WITH MERCURY FILM**

ABSTRACT

A new voltammetric method by modifying the glassy carbon electrode (GCE) with mercury film was studied for the determination of acrylamide (AA) in aqueous solution. The acrylamide demonstrated a defined cathodic peak in -2.3 V. After the study of AA in different supporting electrolytes, the better results were obtained in the presence of KCl 0.1 mol L⁻¹. After the experimental conditions were optimized for the square wave voltammetry (SWV) the current peak was linear to the concentration range of 80 to 800 µg L⁻¹ with correlation coefficient R² = 0.997. The limit of detection and quantification were 24.4 and 81.3 µg L⁻¹, respectively. The quantification method of AA was applied in the crisp and biscuit samples were the results obtained have shown the potential applicability of the method in real samples.

Keywords: Cooches. Crisp. SWV.

REFERÊNCIAS

- ALBISHRI, H. M.; EL-HADY, D. A. Eco-friendly ionic liquid based ultrasonic assisted selective extraction coupled with a simple liquid chromatography for there liable determination of acrylamide in food samples. **Talanta**, London, v. 118, p. 129-136, Jan. 2014.
- ARISSETO, A. P. et al. Determination of acrylamide levels in selected foods in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 24, n. 3, p. 236-241, Mar. 2007.
- BACKE, W. J.; YINGLING, V.; JOHNSON, T. The determination of acrylamide in environmental and drinking waters by large-volume injection: hydrophilic-interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1334, p. 72-78, Mar. 2014.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: J. Wiley, 2001. 864 p.
- CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): a review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 44, n. 4, p. 793-810, May 2011.
- DOERGE, D. R. et al. Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in B6C3F₁ mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 202, n. 3, p. 258-267, Feb. 2005.
- ERIKSSON, S. **Acrylamide in food products: identification, formation and analytical methodology**. 2005. 75 p. Thesis (Ph.D. in Environmental Chemistry) - Stockholm University, Stockholm, 2005.
- ERKEKOGLU, P.; BAYDAR, T. Acrylamide neurotoxicity. **Nutritional Neuroscience**, London, v. 17, n. 2, p. 48-57, 2014.
- GOSSER JÚNIOR, D. K. **Cyclic Voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms**. New York: VCH, 1993. 154 p.

HOENICKE, K. et al. Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 520, n. 1/2, p. 207-215, Aug. 2004.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER.
Acrylamide monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some industrial chemicals. Lyon, 1994. 569 p. (Some Industrial Chemicals, 60).

KERAMAT, J. et al. Acrylamide in baking products: a review article. **Food and Bioprocess Technology**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 530-543, May 2011.

KIM, T. et al. Determination of acrylamide and glycidamide in various biological matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. **Talanta**, London, v. 131, p. 46-54, Jan. 2015.

LI, C. Electrochemical determination of dipyrindamole at a carbon paste electrode using cetyltrimethyl ammonium bromide as enhancing element. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 55, p. 77-83, 2007.

LIU, C. et al. Fluorescence determination of acrylamide in heat-processed foods. **Talanta**, London, v. 123, p. 95-100, June 2014.

LIU, J. et al. Simultaneous analysis of Acrylamide and its key precursors, intermediates, and products in model systems by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 85, n. 19, p. 9262-9271, Oct. 2013.

MICHALAK, J.; GUJSKA, E.; KLEPACKA, J. The effect of domestic preparation of some potato products on acrylamide content. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 66, n. 4, p. 307-312, Nov. 2013.

NIAZ, A. et al. A new simple sensitive differential pulse polarographic method for the determination of acrylamide in aqueous solution. **Talanta**, London, v. 74, n. 5, p. 1608-1614, Feb. 2008.

NIELSEN, N. J. et al. A liquid chromatography: tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in bread. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 557, n. 1/2, p. 211-220, Feb. 2006.

OLIVEIRA, M. F. et al. Simultaneous determination of zinc, copper, lead, and cadmium in fuel ethanol by anodic stripping voltammetry using a glassy carbon-mercury-film electrode. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 380, n. 1, p. 135-140, Sept. 2004.

OMAR, M. M. A.; IBRAHIM, W. A. W.; ELBASHIR, A. A. Sol-gel hybrid methyltrimethoxysilane-tetraethoxysilane as a new dispersive solid-phase extraction material for acrylamide determination in food with direct gas chromatography-mass spectrometry analysis. **Food Chemistry**, Oxford, v. 158, p. 302-309, Sept. 2014.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 771-780, mar./abr. 2004.

STOBIECKA, A.; RADECKA, H.; RADECKI, J. Novel voltammetric biosensor for determining acrylamide in food samples. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 22, n. 9/10, p. 2165-2170, Apr. 2007.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1278-1287, maio 2009.

VESELÁ, H.; ŠUCMAN, E. Determination of Acrylamide in food using adsorption stripping voltammetry. **Czech Journal of Food Sciences**, Prague, v. 31, n. 4, p. 401-406, 2013.

VINCI, R. M.; MESTDAGH, F.; MEULENAER, B. Acrylamide formation in fried potato products: present and future, a critical review on mitigation strategies. **Food Chemistry**, Oxford, v. 133, n. 4, p. 1138-1154, Aug. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food and Drug Administration. Health implications of acrylamide in food. In: _____. **Report of a joint FAO/WHO consultation**. Geneva, 2002. p. 1-39.

ZARGAR, B.; SAHRAIE, N. R.; KHOSHNAMEH, F. Catalytic square-wave voltammetric determination of acrylamide in potato chips. **Analytical Letters**, New York, v. 42, n. 10, p. 1407-1417, 2009.

**ARTIGO 3 (ENSAIO) Estudo da aplicabilidade da FTIR no modo ATR na
identificação de acrilamida em alimentos**

Elisângela de Fátima Lisboa Tavares³

Hélvia Mara Ribeiro Salgado

Adelir Aparecida Saczk

Zuy Maria Magriotis

Artigo normalizado conforme a NBR 6022 (ABNT, 2003).

³ Doutorado em Agroquímica pela Universidade Federal de Lavras
tavareslisboa@yahoo.com.br

RESUMO

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IR-FT) no modo de refletância total atenuada (ATR), foi utilizada para identificar acrilamida sólida (AA) em KBr (AA/KBr), e acrilamida com acetonitrila (AA/ACN). O método utilizando AA/KBr mostrou-se promissor na identificação de acrilamida em 14 amostras sólidas de alimento sem a necessidade de extração.

Palavras-chave: Batata. Biscoitos. Torradas.

1 INTRODUÇÃO

A Acrilamida (AA) é um monômero de fórmula molecular (C_3H_5NO) altamente solúvel em água, acetona, acetonitrila, álcool, e desde a década de 50, a AA é formada industrialmente a partir da hidratação da acrilonitrila. O polímero de AA (poliacrilamida) pode ser aplicado na produção de géis para eletroforese e para clarificar e purificar água potável e esgoto. A acrilamida também é usada na construção de fundações para barragens e túneis (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2002).

Após experimentos mostrarem que a AA pode induzir o aparecimento de tumores em animais, esta foi classificada como provável carcinógeno humano, pela International Agency for Research on Cancer - IARC (1994).

A formação da AA em alimentos ocorre principalmente pela reação do aminoácido asparagina com açúcar redutor (glicose e frutose), dependendo das condições de armazenamento, temperatura de cozimento, e concentração dos precursores no alimento (ARISSETO; TOLEDO, 2007; KERAMAT et al., 2011; VINCI; MESTDAGH; MEULENAER, 2012). Portanto, todo alimento rico em carboidrato (pães, biscoitos, batatas etc), e processado em altas temperaturas produz AA. Vivanti, Finotti e Friedman (2006) estudaram o teor de asparagina e açúcares redutores em 9 espécies de batatas comercializadas na Itália, e 22 espécies comercializadas no Estados Unidos. Os teores de asparagina encontrados variaram de 1,17 a 57,65 mmol Kg⁻¹.

A acrilamida é determinada normalmente por métodos cromatográficos, principalmente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com diversos tipos de detectores, mas também, há estudos com polarografia, voltametria, cromatografia gasosa (CG) e fluorescência. Na Tabela 1 são apresentados métodos relevantes para determinação de AA relatados na literatura.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a viabilidade do uso da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no modo refletância total atenuada (ATR) na identificação da acrilamida em alimentos.

Tabela 1 Metodologias analíticas relevantes para determinação de AA

Matriz	Extração	Método	Recuperação	LD / LQ	Referência
Batata frita	Acetona	Polarografia	NR	3,52/11,76 μgL^{-1}	Zargar, Sahraie e Khoshnam (2009)
Água	-	Polarografia	98,1 – 102%	27 μgL^{-1} / NR	Niaz et al. (2008)
Batata Frita	Água	Voltametria (eletrodo de pasta de carbono modificada com Hb-Fe(II)/Hb-Fe(III))	NR	1,2 x 10 ⁻¹⁰ M	Stobiecka, Radecka e Radecki (2007)
Batata frita Frango frito Biscoito	Água	Fluorescência	66 – 110,6%	0,015mgL ⁻¹ /NR	Liu et al. (2014)
Água	-	HILIC – cromatografia líquida de interação hidrofílica	95 ± 2,5 %	2,4 ngL ⁻¹ /NR	Backe, Yingling e Johnson (2014)
Batata frita Pão	brometo de 1-butil-3-metil-imidazólio (BMIMBr)	HPLC/UV	90,6-109,8 %	25/80 μgL^{-1}	Albrohri e El-Hady (2014)
Ração de cão e gato		Polarografia	98,7-99,9 %	12 μgkg^{-1} /NR	Veselá e Šucman (2013)
Plasma Urina	Acetonitrila	HPLC-MS-MS	60,8 – 63,3 % 42,6 – 46,5 %	NR/5 μgL^{-1} NR/10 μgL^{-1}	Kim et al. (2015)
Batata frita Beringela frita	Sol-gel metiltrimetoxissilano-	GC - MS	88 – 103 %	9,3/28,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 12,6/38,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Omar, Ibrahim e

Matriz	Extração	Método	Recuperação	LD / LQ	Referência
Grão de bico	tetraetoxisilano (MTMOS-TEOS)			10,3/31,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Elbashir (2014)
Batata frita Biscoito Farinha	Água	HPLC-MS-MS	87 – 116% 87 – 97% 94 – 100%	10/30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Hoenicke et al. (2004)
Cacau Comida bebê	Ferri/ZnSO ₄ /NaCl/CH ₃ C OOCH ₂ CH ₃	HPLC-MS-MS GC – MS - MS	84 – 91% 84 – 90%	10/30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 1,5/5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Hoenicke et al. (2004)
Pão	Água	HPLC-MS-MS	93 - 112%	13 $\mu\text{g kg}^{-1}$ /NR	Nielsen et al. (2006)
Batata frita Pão Café Cerveja	Água/MeOH	HPLC-MS-MS	100 - 115%	10/20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Arisseto et al. (2007)
Comida de bebê	20% Água/80%MeOH	RP-HPLC-DAD	106%	10 mg kg^{-1} /NR	Michalak, Gujska e Klepacka (2011)
Batata frita	0,1% Ácido fórmico/Água	FTIR associado ao HPLC/MS	NR	18 /55 $\mu\text{g L}^{-1}$,	Ayvaz et al. (2013)

NR – Não revelado.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes e método de extração

Todos os reagentes químicos de grau analítico foram utilizados sem purificação adicional. Foram preparadas soluções estoque (1000 mg L⁻¹) de acrilamida (Sigma 99%) em acetonitrila (ACN) (Synth 99,8%). As diluições foram feitas por meio da transferência de alíquotas quantitativas da solução estoque para um balão volumétrico de 10,0 mL e completando-se o volume. O brometo de potássio (KBr) foi mantido em estufa até o momento de ser utilizado.

As amostras de batatas palha, chips e biscoitos foram maceradas com almofariz empregando um pistilo e armazenadas em frasco. Analisou-se as amostras sólidas sem nenhum tratamento prévio e após a extração da acrilamida, o que é realizado da seguinte forma: pesa-se cerca de 2 g de amostra em um tubo de ensaio e posteriormente adiciona-se 20 mL de acetonitrila, deixando no ultrassom por 10 minutos, e posteriormente, efetuou-se a filtração. O extrato foi filtrado, desengordurado com hexano, e a fase polar coletada e analisada no FTIR.

2.2 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos no interferômetro da Bomem MB-100. O intervalo foi de 4000 a 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 32 varreduras

a cada espectro em modo ATR. O padrão e as amostras foram dissolvidas em KBr e colocados para análise em um porta-amostras.

2.3 Análise das amostras por FTIR

Os padrões sólidos de AA foram dissolvidos no KBr nas concentrações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9 mg para 200 mg de KBr. As amostras sólidas foram misturadas com o KBr numa quantidade de 200 mg para 2 mg de amostra. Num almofariz de ágata macerou-se o KBr juntamente com o padrão ou a amostra, a mistura já homogeneizada foi aplicada diretamente sob o cristal de diamante do IR.

Os padrões de AA com ACN foram preparados nas concentrações de 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8 e 10 mgL⁻¹. Os Extratos em ACN e os seus padrões foram aplicados sob o cristal de diamante do IR.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise Qualitativa

Os espectros de FTIR dos padrões de AA sólida e com ACN são apresentados nas Figuras 1A, 1B e 1C. As bandas obtidas para a AA pura por ATR sólido e extrato com ACN foram associadas com fortes vibrações de infravermelhos do N-H, C=O, C=C e C-N, que são grupos funcionais presentes na estrutura da acrilamida.

Na Figura 1A, a AA pura sólida, as bandas de 3354 / 3157 cm^{-1} correspondem, a deformação axial de N-H, 1688 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação C=O da função orgânica amida, 1602 cm^{-1} corresponde ao estiramento da dupla ligação C=C, característica de grupo vinil terminal deslocado e 1417 / 663 cm^{-1} referem-se ao estiramento da ligação C-N de amidas primárias.

A Figura 1B apresenta o espectro por ATR da acetonitrila, solvente utilizado para extrair a AA. As bandas em 3008/2932 cm^{-1} referem-se ao estiramento da ligação C-H, as bandas em 2284/2250 referem-se ao estiramento da ligação C-N, e 1443 referem-se ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-N.

Na Figura 1C encontra-se o espectro da AA na presença ACN. As bandas características da AA são atribuídas aos grupos N-H, C=O, C=C e C-N, são 3174, 1636, 1541 e 667 cm^{-1} , respectivamente.

As bandas apresentadas pelo padrão puro de AA são muito mais nítidas do que na presença do solvente extrator ACN. A ACN possivelmente interfere na absorção da AA.

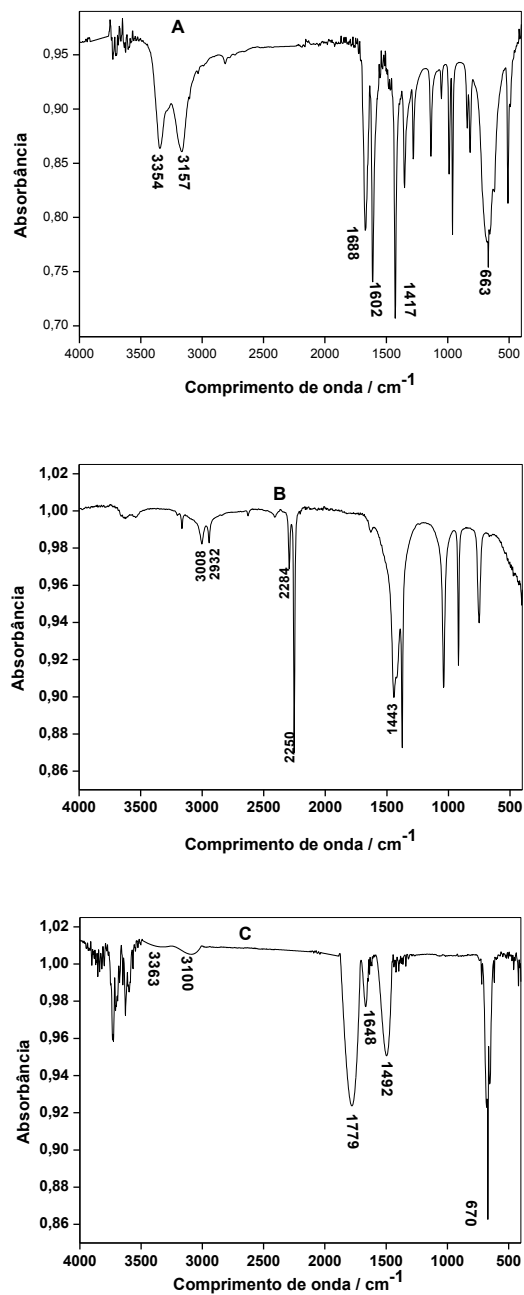


Figura 1 Espectros A (AA sólida), B (ACN) e C (AA em ACN)

Na Figura 2 são apresentados os espectros IR-FT para as amostras de batatas “palha”, chips e mandioca frita. Observa-se que o estiramento da carbonila em 1700 cm^{-1} está presente em todas as amostras como as também as outras bandas características da AA: como entre 3400 e 3140 cm^{-1} que é referente a ligação N-H, 1652 cm^{-1} referente a ligação C=C e $1470/700\text{ cm}^{-1}$ referente a ligação C-N. Isto indica que a AA está presente em todas as amostras.

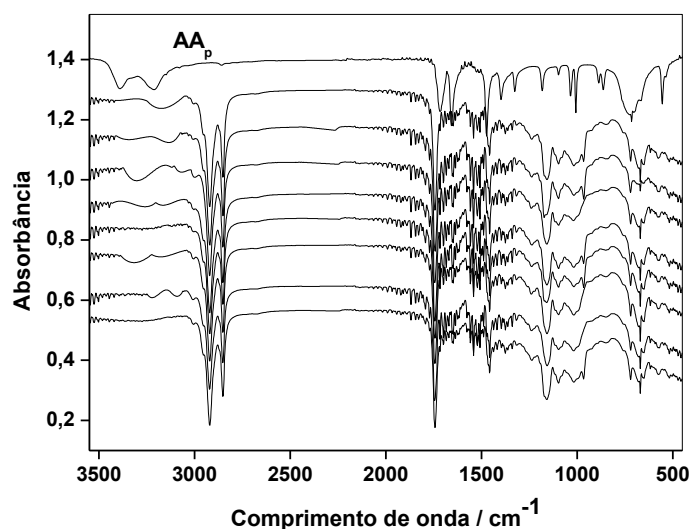


Figura 2 Espectros de IR-FT de AA padrão (AAp) e amostras de batatas chips e “palha”

Os espectros apresentados na Figura 2 são referentes ao AAp e as amostras de biscoitos e torradas. Observa-se que a AA está presente também nestas amostras devido a presença das bandas características 1720 cm^{-1} que refere-se a ligação C=O, as bandas compreendidas entre

3400 a 3080 cm^{-1} referem-se a ligação N-H, 1630 cm^{-1} refere-se a ligação C=C e 1530/678 cm^{-1} refere-se a ligação C-N.

4 CONCLUSÃO

Este estudo visou a exploração da viabilidade do uso do IR-FT na identificação de AA em alimentos. O método mostrou-se promissor na identificação e possível quantificação de AA em amostras sólidas de alimentos, sem a necessidade de extração.

**APPLICABILITY STUDY OF IR-FT MODE ATR ON THE
IDENTIFICATION ACRYLAMIDE IN FOOD**

ABSTRAT

The Infrared Spectroscopy Fourier Transform (FTIR) in attenuated total reflectance (ATR) mode was used to identify solid acrylamide (AA) with KBr (AA/KBr) and acrylamide solid with acetonitrile (AA/ACN). The method using AA / KBr showed promise in the identification of acrylamide in 14 solid food samples without extraction.

Keywords: Potato. Cookies. Crips.

REFERÊNCIAS

- ALBISHRI, H. M.; EL-HADY, D. A. Eco-friendly ionic liquid based ultrasonic assisted selective extraction coupled with a simple liquid chromatography for there liable determination of acrylamide in food samples. **Talanta**, London, v. 118, p. 129-136, Jan. 2014.
- ARISSETO, A. P. et al. Determination of acrylamide levels in selected foods in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 24, n. 3, p. 236-241, Mar. 2007.
- ARISSETO, A. P.; TOLEDO, M. C. F. Acrilamida em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 2, p.123-134, 2006.
- AYVAZ, H. et al. Application of infrared microspectroscopy and chemometric analysis for screening the acrylamide content in potato chips. **Analytical Methods**, London, v. 5, n. 8, p. 2020-2027, 2013.
- BACKE, W. J.; YINGLING, V.; JOHNSON, T. The determination of acrylamide in environmental and drinking waters by large-volume injection: hydrophilic-interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1334, p. 72-78, Mar. 2014.
- HOENICKE, K. et al. Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 520, n. 1/2, p. 207-215, Aug. 2004.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Acrylamide monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some industrial chemicals**. Lyon, 1994. 569 p. (Some Industrial Chemicals, 60).
- KERAMAT, J. et al. Acrylamide in baking products: a review article. **Food and Bioprocess Technology**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 530-543, May 2011.

KIM, T. et al. Determination of acrylamide and glycidamide in various biological matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. **Talanta**, London, v. 131, p. 46-54, Jan. 2015.

LIU, C. et al. Fluorescence determination of acrylamide in heat-processed foods. **Talanta**, London, v. 23, p. 95-100, June 2014.

MICHALAK, J.; GUJSKA, E.; KLEPACKA, J. The effect of domestic preparation of some potato products on acrylamide content. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 66, n. 4, p. 307-312, Nov. 2011.

NIAZ, A. et al. A new simple sensitive differential pulse polarographic method for the determination of acrylamide in aqueous solution. **Talanta**, London, v. 74, n. 5, p. 1608-1614, Feb. 2008.

NIELSEN, N. J. et al. A liquid chromatography: tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in bread. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 557, n. 1/2, p. 211-220, Feb. 2006.

OMAR, M. M. A.; IBRAHIM, W. A. W.; ELBASHIR, A. A. Sol-gel hybrid methyltrimethoxysilane-tetraethoxysilane as a new dispersive solid-phase extraction material for acrylamide determination in food with direct gas chromatography-mass spectrometry analysis. **Food Chemistry**, Oxford, v. 158, p. 302-309, Sept. 2014.

STOBIECKA, A.; RADECKA, H.; RADECKI, J. Novel voltammetric biosensor for determining acrylamide in food samples. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 22, n. 9/10, p. 2165-2170, Apr. 2007.

VESELÁ, H.; ŠUCMAN, E. Determination of Acrylamide in dry feedstuff for dogs and cats. **Acta Veterinaria Brno**, Brno, v. 82, n. 2, p. 203-208, 2013.

VINCI, R. M.; MESTDAGH, F.; MEULENAER, B. Acrylamide formation in fried potato products: present and future, a critical review on mitigation strategies. **Food Chemistry**, Oxford, v. 133, n. 4, p. 1138-1154, Aug. 2012.

VIVANTI, V.; FINOTTI, E.; FRIEDMAN, M. Level of Acrylamide precursors asparagine, fructose, glucose, and sucrose in potatoes sold at retail in Italy and in the United States. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 2, p. C81-C85, Mar. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Acrylamide in food: frequently asked questions**. Geneva, 2002. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/acrylamide_faqs.pdf>. Acesso em: 14 maio 2015.

ZARGAR, B.; SAHRAIE, N. R.; KHOSHNAMEH, F. Catalytic square-wave voltammetric determination of acrylamide in potato chips. **Analytical Letters**, New York, v. 42, n. 10, p. 1407-1417, 2009.

ANEXOS

ANEXO A - Descrição sobre as técnicas eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas são baseadas na relação entre as propriedades elétricas das espécies eletroativas presentes na solução (corrente, potencial e carga) com os parâmetros químicos. Com isso, qualquer espécie química que seja eletroativa, ou seja, que possa ser oxidada ou reduzida na superfície do eletrodo pode ser determinado por esta técnica. As vantagens do uso dos métodos de eletroanálise são: capacidade de especificação, possibilidade de análise direta na amostra, boa sensibilidade e seletividade, baixos limites de detecção, instrumentação portátil, custo baixo tanto na aquisição quanto na manutenção dos equipamentos e análise *in situ* (BRETT; BRETT, 1998; LOWINSOLUR; BERTOTTI, 2006; WANG, 2001). Esta técnica pode ser utilizada para determinação de compostos inorgânicos e orgânicos em diversas matrizes.

A voltametria é uma técnica eletroanalíticas, onde se obtém informações qualitativas e quantitativas, é baseada nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. O eletrodo de trabalho é o responsável pelo sinal analítico, sendo que este sinal é medido a partir da aplicação de um potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. A versatilidade da voltametria pode ser observada pela possibilidade de estudar diversos processos de oxidação e redução em várias matrizes, mecanismos de transferência de elétrons em superfície de eletrodo modificados (SKOOG; HOLLER; NIEMAM, 2002).

Segundo Wang (2001) o uso das medidas elétricas para fins analíticos apresenta inúmeras aplicações, tais como monitoramento ambiental, controle de qualidade da indústria e análises biomédicas.

VOLTAMETRIA CÍCLICA

Para a obtenção de informações qualitativas, a técnica mais utilizada é a Voltametria cíclica (CV), pois possui uma capacidade de fornecer rapidamente informações importantes sobre a termodinâmica dos processos redox, da cinética da reação de transferência de elétrons heterogênea, e sobre as reações de acoplamento ou processos de adsorção. Frequentemente a CV é o primeiro experimento a ser realizada por oferecer a localização dos potenciais redox das espécies eletroativas, reversibilidade do processo eletroquímico e ferramentas para o estudo do mecanismo e velocidades das reações de redox (WANG, 2001).

A voltametria cíclica consiste em variar o potencial linearmente de um eletrodo de trabalho pequeno em uma solução sem agitação utilizando uma forma de onda triangular potencial (Figura 1).

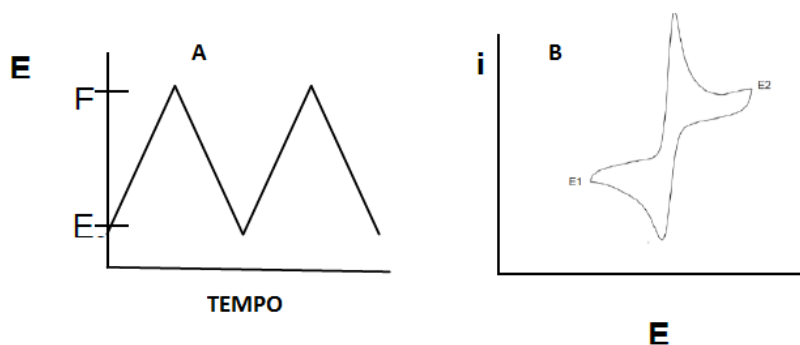


Figura 1: Aplicação do potencial para a voltametria cíclica: A) potencial com varredura linear e B) voltamograma obtido para um sistema reversível

VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

As técnicas voltamétricas de pulso são destinadas para uma maior discriminação entre a corrente faradaica e a corrente capacitiva, diminuindo assim os limites de detecção. As diferentes técnicas de pulso são baseadas em medidas de potencial/corrente em pequenos intervalos de tempo (WANG, 2001).

A voltametria de pulso diferencial é uma técnica muito útil na determinação de traços de espécies orgânicas e inorgânicas (WANG, 2001). Neste tipo de voltametria a corrente é medida duas vezes alternadamente (Figura 2 A). A primeira medida de corrente é feita em S_1 logo antes da aplicação do pulso, e outra em S_2 , imediatamente após o final do pulso. A diferença de corrente por pulso Δi é registrada em função do aumento linear da voltagem. Como resultado, temos uma curva diferencial com um pico, como mostra a Figura 2 B. A altura do pico é diretamente proporcional à concentração (SKOOG; HOLLER; NIEMAM, 2002).

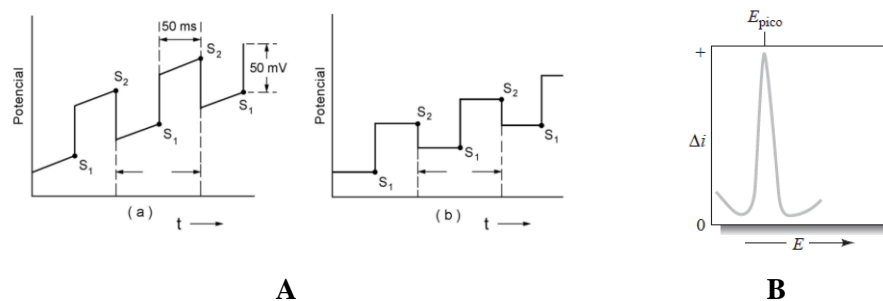


Figura 2: (A): Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo em voltametria de pulso diferencial. (a) Em instrumentos analógicos; (b) Em instrumentos digitais. A corrente é amostrada em S_1 e S_2 e a diferença

entre elas é que é registrada: $\Delta I = I_{S_a} - I_{S_1}$. (B): Voltamograma de pulso diferencial registrado em aparelhagem digital.

VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

A voltametria de onda quadrada (SWV), do inglês “Square Wave Voltammetry”, é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003) Ela também apresenta ao analista a opção de reduzir o ruído de fundo por repetidas varreduras e cálculo da média (TEÓFILO et al., 2004).

A voltametria de onda quadrada envolve uma variação de potencial na forma de escada (staircase). Segundo Silva et al. (2012), neste caso aplica-se pulsos de potenciais de altura A (amplitude) constante em uma escada de potenciais com largura ΔE_s (incremento de varredura) e duração t como mostra a Figura 3. A corrente é medida duas vezes, uma ao final do pulso direto, quando a direção do pulso é a mesma da varredura, e outro ao final do pulso reverso, onde a direção do pulso é contrária a direção da varredura. O voltamograma resultante consiste da diferença entre estas duas correntes versus a rampa de potencial aplicado.

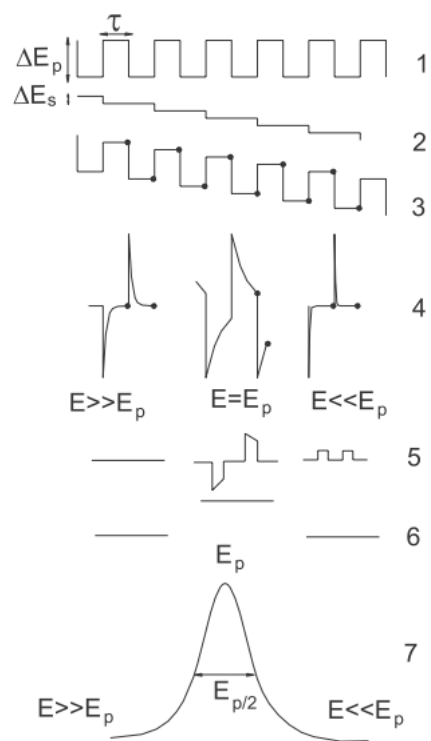


FIGURA 3: Representação esquemática da voltametria de onda quadrada, onde: 1) potencial na forma de onda; 2) escada de potencial; 3) forma de aplicação do potencial na SWV; 4) forma da onda da corrente; 5) sinal da corrente; 6) corrente diferencial e 7) corrente total (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

ANEXO B - Descrição sobre a técnica espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A Espectroscopia no infravermelho é uma técnica analítica muito versátil, pois permite a determinação qualitativa de compostos orgânicos e inorgânicos e quantitativos de compostos orgânicos, nos estados sólido, líquido e gasoso. A região espectral que corresponde ao infravermelho compreende a radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 14000 a 400 cm^{-1} , sendo dividida em infravermelho próximo (4000 a 14000 cm^{-1}) e infravermelho médio (400 a 14000 cm^{-1}). A região mais utilizada nos estudos de compostos orgânicos é a do infravermelho médio (BARBOSA, 2008; SKOOG; HOLLER; NIEMAM, 2002).

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica rápida, exige um mínimo de preparação das amostras permitindo análise qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos, pois as intensidades de absorção das bandas no espectro são proporcionais à concentração (SKOOG; HOLLER; NIEMAM, 2002).

O uso da espectroscopia de infravermelho traz muitas vantagens, tais como: redução do tempo de análise, diminuição da quantidade de amostras, capacidade de identificar ou caracterizar estruturas complexas, não destruição da amostra. Esta técnica está sendo muito utilizada em linhas de produção, no controle de processos industriais (LOPES; FASCIO, 2004).

REFERÊNCIAS

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa, MG: UFV, 2008.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Almeida, 1993. 471 p.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 670-673, jul./ago. 2004.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1318-1325, nov./dez. 2006.

SILVA, J. G. et al. Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of rutin in soybean cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 25, n. 1, p. 1-8, Feb. 2012.

SKOOG, A. D.; HOLLER, F. J.; NIEMAM, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada: primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 81-89, jan./fev. 2003.

TEÓFILO, R. F. et al. Experimental design employed to square wave voltammetry response optimization for the glyphosate determination. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, n. 6, p. 865-871, Nov./Dec. 2004.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2001. 209 p.