



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC5515 – Estágio Supervisionado

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DESENVOLVIDO NO
LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA
AGROPECUÁRIA (LFDA) - SEÇÃO LABORATORIAL
AVANÇADA (SÃO JOSÉ/SC)**

PATRICIA BRUGNEROTTO

**Orientador: Profe. Dr. Luciano Vitali
Supervisor: Dr. Rodrigo Barcellos Hoff**

Florianópolis
Outubro/2020

Patricia Brugnerotto

**UTILIZAÇÃO DO SOFTWARE PEAKMASTER® COMO FERRAMENTA DE
OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA POR ELETROFORESE CAPILAR PARA
APLICAÇÃO EM PRODUTOS CÁRNEOS**

Projeto de Estágio Supervisionado (QMC 5515)
apresentado ao Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa Catarina desenvolvido
no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária –
Seção Laboratorial Avançada de São José/SC

Supervisor: Dr. Rodrigo Barcellos Hoff

Florianópolis
Outubro/2020

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Rodrigo Barcellos Hoff e Heitor Daguer pela oportunidade de realizar o estágio no LFDA/SLAV-SC, pelos ensinamentos e todas as contribuições que foram essenciais para minha formação profissional.

A Carolina T. P. Deolindo, ao Luan V. A. de Oliveira e ao Ms. Cristian Kleemann por compartilharem comigo suas experiências na rotina de laboratório e que de todas as formas sempre estavam disponíveis para me ajudar.

A todos os funcionários do LFDA/SLAV-SC que, mesmo com pouco tempo de convivência, de alguma forma me ajudaram ou contribuíram durante o estágio.

Ao professor Prof. Dr. Luciano Vitali, por aceitar ser meu orientador neste trabalho e pelas sugestões e disponibilidade.

A Universidade Federal de Santa Catarina por fornecer suporte para minha formação acadêmica.

RESUMO

A RDC nº 272, de 14 de março de 2019 autorizou o uso do ácido acético (diacetato de sódio) e ácido propiônico (ou propionato de sódio ou de potássio) como aditivos em produtos cárneos, em teores máximo de 0,1 e 0,5 g 100 g⁻¹, respectivamente. Considerando a necessidade de monitorar esses compostos por meio de análises fiscais, esse trabalho teve como objetivo otimizar um método rápido para determinação de ácidos acético e propiônico em produtos cárneos com auxílio de um software de simulação denominado Peakmaster[®]. Os parâmetros otimizados compreenderam a utilização de um capilar de sílica fundida com 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno. O eletrólito de corrida foi composto por ácido ftálico (10 mmol L⁻¹), tris(hidroximetil)aminometano (19 mmol L⁻¹) e brometo de cetiltrimetilamônio (0,6 mmol L⁻¹). As demais condições foram, injeção hidrodinâmica de 50 mbar/3 s, tensão de 20 KV (polaridade negativa no sítio de injeção), temperatura do cartucho de 20 °C e detecção indireta (230 nm). Uma solução com os padrões de ácidos acético (10 mg L⁻¹), propiônico (50 mg L⁻¹) e glioxílico (padrão interno, 15 mg L⁻¹) foi utilizada para realizar as análises no equipamento de eletroforese capilar e os resultados obtidos experimentalmente foram muito similares aos obtidos no Peakmaster[®]. Neste trabalho o preparo de amostra proposto foi simples e rápido, sendo uma etapa de limpeza empregada com acetonitrila 50% (H₂O:Acetonitrila, v/v). Análises qualitativas e exploratórias do método proposto indicaram a comigração de um analito de interesse com interferente, dessa forma, o método ainda precisará ser ajustado para dar continuidade na validação analítica.

Palavras-chave: Ácido acético. Ácido propiônico. Análise fiscal. Eletroforese capilar. Peakmaster[®]. Produtos cárneos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar. Onde e1 e e2 são os eletrodos, D é o detector e C é o computador para aquisição e tratamento dos dados.....11
- Figura 2.** Representação do fluxo eletrosmótico e dos modos de separação (A) contraeletrosmótico e (B) co-eletrosmótico.....12
- Figura 3.** Representação do preparo de amostra proposto.....18
- Figura 4.** Curva de mobilidade efetiva *versus* pH para os ácidos acético, propiônico e glioxílico.....20
- Figura 5.** Representação da interface do Peakmaster® com condições previamente otimizadas e a separação do 1 - ácido acético, 2 - ácido glioxílico (padrão interno); 3 - ácido propiônico.....22
- Figura 6.** Eletroferograma da separação do (1) acético (2 mg L⁻¹), (2) padrão interno (ácido glioxílico, 15 mg L⁻¹) e (3) propiônico (10 mg L⁻¹) em solução aquosa. Legenda: Ácido ftálico (10 mmol L⁻¹), TRIS (19 mmol L⁻¹), CTAB (0,6 mmol L⁻¹), pH 6,1, injeção 50 mbar/3 s, -20 kV, 40 cm (31,5 cm × 75 μm), 20 °C, detecção indireta em 230 nm.....23
- Figura 7.** Seletividade do método proposto simulada no Peakmaster®. Legenda: 1 - ácido cítrico; 2 - ácido acético; 3 - ácido glioxílico (padrão interno); 4 - ácido láctico; 5 - ácido propiônico; 6 - ácido glutâmico.....25
- Figura 8.** Eletroferograma da separação da (a) amostra e da (b) amostra com solução dos analitos (10,0; 50,0 e 15 mg L⁻¹ de acético, propiônico e glioxílico, respectivamente). Condições de separação: ácido ftálico (10 mmol L⁻¹), TRIS (19 mmol L⁻¹), CTAB (0,6 mmol L⁻¹), pH 6,1, injeção 50 mbar/3 s, -20 kV, 40 cm (31,5 cm × 75 μm), 20 °C, detecção indireta em 230 nm. Legenda: * - desconhecido; 1 - ácido acético; 2 - ácido glioxílico (padrão interno); # - suspeita de comigração de analitos; 3 + # - comigração de analitos (láctico + propiônico).....26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGE	Eletrólito de corrida, do inglês <i>background electrolyte</i>
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DAD	detector por arranjo de diodos
FEO	Fluxo eletrosmótico
CZE	Eletroforese Capilar de Zona (do inglês, <i>Capillary Zone Electrophoresis</i>)
LFDA	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
P.I.	Padrão Interno
SLAV-SC	Seção Laboratorial Avançada de São José, Santa Catarina
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA.....	8
2. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 Eletroforese capilar de zona.....	11
3.2 Peakmaster® como ferramenta de otimização de método por eletroforese capilar.....	14
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo Geral.....	16
4.2 Objetivos específicos.....	16
5. METODOLOGIA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTAGIO SUPERVISIONADO.....	17
5.1 Padrões, reagentes e soluções.....	17
5.2 Preparo das soluções estoque.....	17
5.3 Amostra e preparo de amostra.....	17
5.4 Instrumentação e condições de separação.....	18
6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ESTÁGIO.....	19
6.1 Otimização das condições experimentais da técnica e do eletrólito de corrida.....	19
6.2 Seletividade teórica.....	24
6.3 Avaliação qualitativa.....	25
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	27
8. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL.....	28
9. REFERÊNCIAS.....	29

1. JUSTIFICATIVA

Aditivo alimentar é caracterizado como qualquer ingrediente, adicionado intencionalmente aos alimentos sem propósito de nutrir, mas com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao adicioná-lo poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento ¹. Portanto, os aditivos alimentares são comumente usados para conservar alimentos e inibir o crescimento de microrganismos ². Além de ser um tratamento simples e de baixo custo, o uso de ácidos orgânicos com ação conservante (antimicrobiano ou antifúngico), principalmente contra patógenos como a *Salmonella*, tem sido relatado como eficazes ³.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), juntamente com o Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária são os órgãos legisladores e fiscalizadores de alimentos. Com relação a fiscalização do uso de aditivos alimentares e suas concentrações em carnes e produtos cárneos, as tomadas de decisões eram baseadas na Instrução Normativa nº 51, de 29 de dezembro de 2006. No entanto, esta foi revogada pela RDC nº 272, de 14 de março de 2019. Anteriormente, o ácido acético era permitido para uso, porém em quantidade suficiente (q.s.); atualmente, além da RDC autorizar o uso de ácido acético (diacetato de sódio) em concentração máxima de 0,1 g 100 g⁻¹, também autorizou o uso de ácido propiônico (ou propionato de sódio ou de potássio) em concentração máxima de 0,5 g 100 g⁻¹.

O Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA), Seção Laboratorial Avançada de Santa Catarina (SLAV-SC), pertencente à rede laboratorial oficial do MAPA, busca constantemente o desenvolvimento e inovação de metodologias analíticas rápidas, de baixo custo e ao mesmo tempo com qualidade analítica e metrológica. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo otimizar uma metodologia analítica empregando eletroforese capilar baseada em informações da literatura ⁴. O software *freeware* Peakmaster[®] foi empregado para simular as concentrações do eletrólito de corrida, tamanho do capilar e tensão aplicada na injeção para posterior aplicação nas análises experimentais. Todo o trabalho foi realizado na SLAV-SC. É importante salientar que, apesar da otimização da

metodologia analítica ser a atividade principal desenvolvida na SLAV e escolhida para descrição deste trabalho, outras atividades também foram acompanhadas durante o período de estágio. Entre as atividades destacam-se: O preparo de amostras de rações animais para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; A execução da determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos por eletroforese capilar; A abertura de amostras de mexilhão, a qual será utilizada em um projeto de mestrado de monitoramento de biotoxinas marinhas na SLAV/SC.

2. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

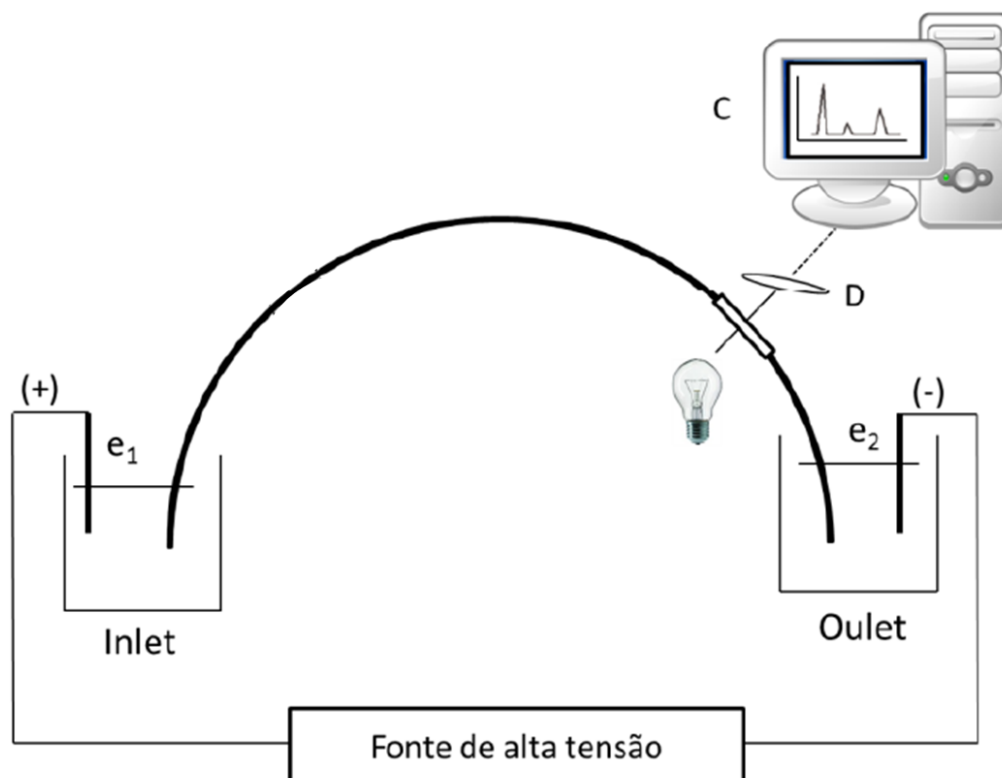
Os Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA) são os laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e possuem atribuições como: realizar análises oficiais, atuar como referência nacional em assuntos laboratoriais, realizar auditoria em laboratórios credenciados, além de realizar ações de pesquisa, desenvolvimento e inovação em métodos analíticos. Além disso, os LFDA desempenham ações de monitoramento, controle e fiscalização de alimentos, bebidas e insumos produzidos e comercializados no Brasil. Os laboratórios oficiais operam em diversas unidades, distribuídos em Região Norte (Belém/PA); Região Nordeste (Recife/PE); Região Centro-Oeste (Goiânia/GO); Região Sudeste (Pedro Leopoldo/MG e Campinas/SP) com Seções Avançadas em Belo Horizonte (SLAV 1 – MG), Andradas e Varginha (SLAV 2 – MG) e Jundiaí (SLAV/SP); e Região Sul (Porto Alegre/RS) com Seção Avançada em São José/SC (SLAV-SC). A SLAV-SC está localizada no Bairro Kobrasol, município de São José, região Metropolitana de Florianópolis/SC. Dispõe de duas unidades laboratoriais: Laboratório de Alimentos e Medicamentos para Animais e Laboratório de Produtos de Origem Animal. Atuam ativamente no desenvolvimento e validação de novos métodos analíticos para controle e monitoramento químico de alimentos (pescados, produtos de origem animal e rações para animais), com o objetivo de manter o escopo atualizado quanto as novas demandas que podem ser de análises de novos produtos e/ou aditivos, além de fraudes. Devido a isso, fornecem valiosas informações para os serviços de inspeção e fiscalização, corroborando em pesquisas voltadas a segurança do alimento e à detecção de fraudes econômicas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Eletroforese capilar de zona

A eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*) é uma técnica de separação que opera em meio líquido (eletrólito condutor) e utiliza essencialmente um capilar, normalmente de sílica fundida. A separação ocorre após a aplicação de um potencial elétrico, e a velocidade e direção de migração das espécies (neutras, iônicas ou ionizáveis) será de acordo com sua massa e carga, respectivamente ⁵⁻⁷. Um sistema de eletroforese é composto por um tubo capilar (sílica fundida), sistema de injeção, fonte de alta tensão (até ± 30 KV), dois eletrodos de platina (uma extremidade positiva e outra negativa) e um detector. Esse equipamento é acoplado a um computador com um software específico para aquisição e tratamento dos dados, conforme apresentado na Figura 1.

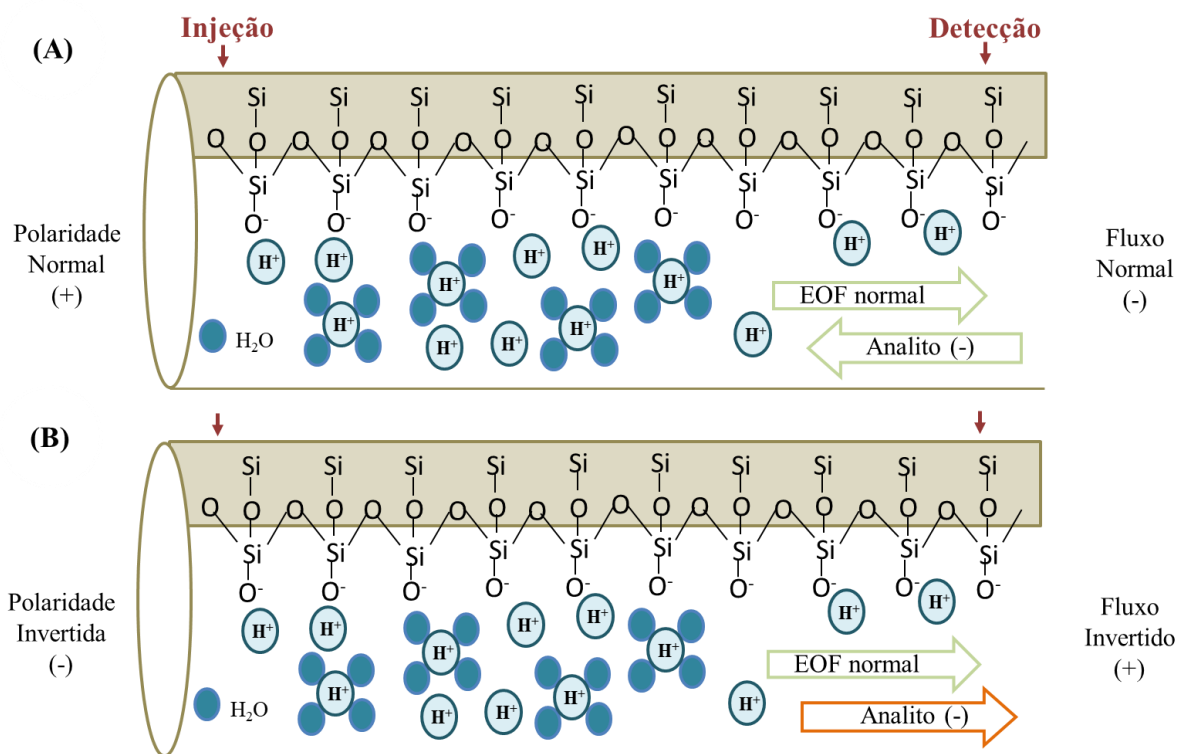
Figura 1. Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar. Onde e1 e e2 são os eletrodos, D é o detector e C é o computador para aquisição e tratamento dos dados.



Fonte: Adaptado de Landers (2008).

Sob a ação do campo elétrico dentro do capilar, íons carregados positivamente movem-se em direção ao cátodo (eletrodo de carga negativa) e íons carregados negativamente movem-se em direção ao ânodo (eletrodo de carga positiva) ⁸. Uma característica inerente à utilização de capilar de sílica fundida é a geração do fluxo eletrosmótico (EOF do inglês, *Electroosmotic Flow*). A parede interna do capilar apresenta uma camada de grupos silanóis (SiH_4O) - conforme representado na Figura 2 - e, por possuírem caráter ácido ($\text{pH} > 2$), quando entram em contato com meio aquoso (eletrólito de corrida) sofrem dissociação. Como consequência, tornam a parede interna do capilar carregada negativamente e liberam os prótons H^+ para a solução que preenche o capilar ^{9,10}. Ao aplicar uma tensão, os prótons migram em direção ao cátodo carregando as suas moléculas de água solvatadas e gerando um fluxo de líquido no capilar, denominado EOF. Sem distinção de carga, esse fluxo é responsável por conduzir os analitos até o detector ^{9,11}.

Figura 2. Representação do fluxo eletrosmótico e dos modos de separação (A) contraeletrosmótico e (B) co-eletrosmótico.



Fonte: Adaptado de Costa ¹².

No entanto, entre pH 2 e 6 a mobilidade do EOF é praticamente desprezível devido a menor quantidade de grupos silanóis ionizados ¹³. Além disso, principalmente na determinação de ânions, o EOF pode aumentar o tempo de análise considerando que este e o ânion migram em direções opostas, ou modo contra-eletrosmótico (Figura 2a). Na determinação de ânions, além de ser essencial a inversão da polaridade na injeção, para que os analitos migrem para o eletrodo de carga oposta, uma estratégia para diminuir o tempo de análise, é a inversão do EOF. Para inversão da polaridade é utilizado o sinal “-” no software de aquisição de dados, enquanto a inversão do fluxo é realizada pela adição de um surfactante catiônico na composição do eletrólito de corrida. De acordo com a representação da Figura 2b, ambos migram na mesma direção (co-eletrosmótico) e, devido a isso, ocorre uma soma das suas mobilidades permitindo uma redução no tempo de análise.

Outras características inerentes a CZE são os métodos de injeção, tipos de detectores e modos de injeção. Com relação aos métodos de injeção, os compostos podem ser introduzidos no capilar por meio de uma diferença de potencial (injeção eletrocinética) ou por diferença de pressão (injeção hidrodinâmica), sendo que ambas são aplicadas entre os reservatórios (eletrólito de corrida e amostra) e o capilar ⁷. Como na injeção hidrodinâmica o volume injetado depende principalmente do tempo de injeção, este método representa maior reprodutibilidade quando comparado a injeção eletrocinética a qual depende das mobilidades dos analitos e do EOF. Além disso, de acordo com as publicações mais recentes, a injeção por pressão é amplamente utilizada em diferentes áreas da pesquisa ¹⁴⁻¹⁷.

De acordo com Vaz, de Oliveira, de Oliveira ¹⁸ a ECZ é compatível com diferentes detectores, incluindo, espectrometria de massas, amperométrico, fluorescência, condutividade e Ultravioleta-visível (UV-vis), sendo este último o mais utilizado devido ao menor custo e versatilidade. O uso do detector UV-vis na eletroforese capilar permite que os compostos sejam detectados no modo direto ou indireto. A detecção indireta é aplicada quando os analitos de interesse não possuem grupos cromóforos – à exemplo, ácidos acético e propiônico - ou possuem baixa absorvidade molar na região do UV-vis. Portanto, nesse caso, um composto cromóforo é adicionado ao eletrólito de corrida e quando a solução passa pelo detector ocorre uma queda no sinal (picos negativos), devido a diminuição da absorbância do composto cromóforo ^{5,18}. O espectro UV-vis do cromóforo é continuamente observado e, um determinado comprimento de onda, o qual deve ser preferencialmente o de

maior absorvância, é monitorado em função do tempo para gerar o eletroferograma¹⁸.

De maneira geral, a CZE é empregada para determinar diversas classes de compostos em diferentes matrizes, por exemplo, compostos inorgânicos em cervejas¹⁵ e frutos do mar¹⁴, açúcares, minerais e ácidos orgânicos em polens¹⁹, ácidos orgânicos em sucos de fruta²⁰, e aminas biogênicas em produtos lácteos²¹. No entanto, até o momento não foram encontrados estudos de determinação de ácidos orgânicos, em especial acético e propiônico, em produtos cárneos.

Os ácidos acético ($C_2H_4O_2$; $60,05 \text{ g mol}^{-1}$; pka 4,76) e propiônico ($C_3H_6O_2$; $74,08 \text{ g mol}^{-1}$; pka 4,87) são ácidos monocarboxílicos saturados, moléculas não cromóforas e solúveis em água. Esses ácidos também são aditivos autorizados para uso em produtos cárneos¹ e seus limites máximos são de 0,1 e 0,5 g 100 g^{-1} , respectivamente. Portanto, considerando a autorização para tal uso, é evidente a existência de uma futura demanda de análise fiscal para esses aditivos em produtos cárneos.

3.2 Peakmaster® como ferramenta de otimização de método por eletroforese capilar

O Peakmaster® é um programa *freeware* e empregado para simular diversos parâmetros inerentes a um método por CZE. Os principais parâmetros que podem ser utilizados para desenvolver ou otimizar um método por EC por meio do Peakmaster® é o tamanho total e efetivo do capilar, polaridade na injeção (positiva ou negativa), tensão (kV), fluxo eletrosmótico, aquisição do sinal (direto ou indireto), composição e concentração dos componentes do eletrólito de corrida, além do pH, força iônica e capacidade tamponante do eletrólito de corrida. Outras características, tais como tempo (s), pressão de injeção (mbar) e diâmetro interno do capilar (μm) são inerentes à técnica de EC. Geralmente os resultados obtidos na simulação são muito similares as obtidas experimentalmente e como grande vantagem se destaca a minimização de geração de resíduos químicos.

O *software* foi desenvolvido por Gaš et al.²² e, de acordo com as informações retiradas do site *Scopus*, entre 2002 e 2020 um total de 40 trabalhos científicos, publicados em diferentes revistas internacionais, utilizaram o Peakmaster®. Além disso, das afiliações (instituições de ensino ou empresas) computadas, a Universidade Federal de Santa Catarina é a segunda instituição que mais usou o programa, contabilizando nove trabalhos científicos e ficando à frente da Universidade

de São Paulo (quatro trabalhos) e Universidade Federal de Juiz de Fora (três trabalhos). As palavras-chave que correspondem a esses achados foram “*Peakmaster® and capillary electrophoresis*”.

4.OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Empregar o software Peakmaster® para otimizar um método de separação de ácidos acético e propiônico por eletroforese capilar para aplicação em produtos cárneos.

4.2 Objetivos específicos

As atividades associadas ao objetivo geral do trabalho foram divididas em objetivos específicos, constituindo em:

- Empregar a ferramenta de simulação Peakmaster® para otimizar a concentração dos componentes do eletrólito de corrida;
- Empregar a ferramenta de simulação Peakmaster® para definir o comprimento do capilar (total e efetivo), tensão aplicada, polaridade, e o modo de detecção;
- Utilizar soluções de concentração conhecida dos padrões para averiguar a eficácia das condições otimizadas na prática;
- Avaliar um preparo de amostra simples e rápido dos produtos cárneos;
- Aplicar o método com as condições otimizadas em amostras de produtos cárneos.

5. METODOLOGIA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTAGIO SUPERVISIONADO

5.1 Padrões, reagentes e soluções

Água ultrapura foi obtida através de um sistema Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) e foi utilizada para preparo de soluções e condicionamento do capilar. Ácidos acético, propiônico, ftálico e glioxílico monoidratado, bem como TRIS (do inglês, *tris(hydroxymethyl)aminomethane*) e CTAB (do inglês, *cetyl trimethyl ammonium bromide*) todos em grau P.A., foram adquiridos da Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, E.U.A.). Hidróxido de sódio (NaOH) grau P.A. foi adquirido da Neon (São Paulo, SP, Brasil).

5.2 Preparo das soluções estoque

As soluções estoque de 100 mg L^{-1} e 500 mg L^{-1} dos ácidos acético e propiônico, respectivamente, foram preparadas independentemente em 100 mL de água ultrapura e armazenadas a $4 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, com auxílio de micropipeta, foram retiradas alíquotas de cada solução individual para o preparo de uma solução “mix”, na concentração de 10 mg L^{-1} de ácido acético e 50 mg L^{-1} de ácido propiônico. A essa solução foi adicionado o padrão interno ácido glioxílico na concentração de 15 mg L^{-1} .

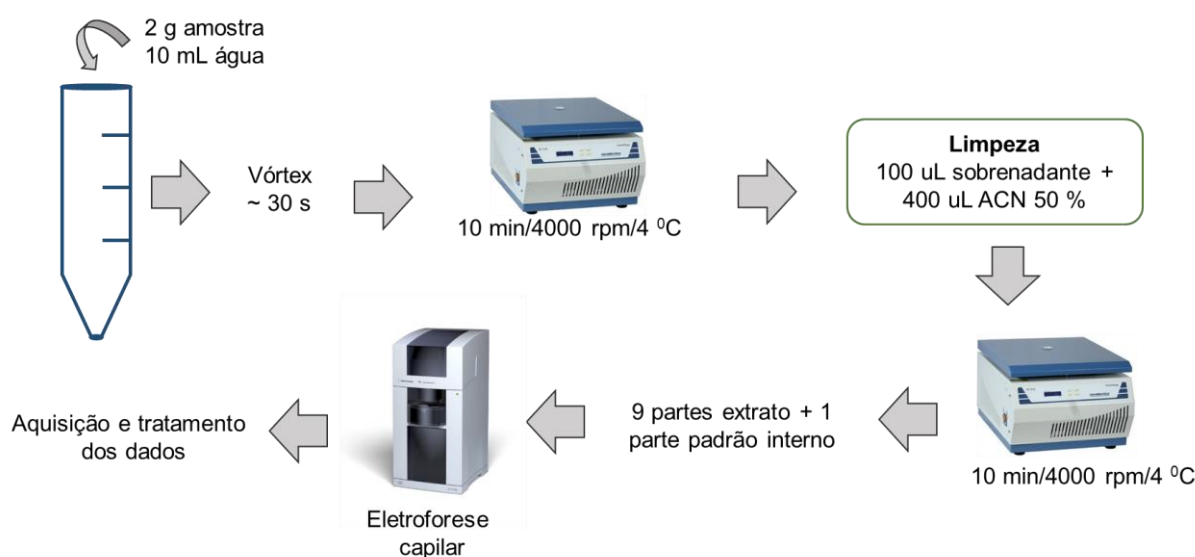
5.3 Amostra e preparo de amostra

Uma amostra de mortadela foi adquirida em comércio local de São José, estado de Santa Catarina. A amostra foi manualmente fracionada e uma quantidade representativa foi triturada com auxílio de um processador de alimentos portátil até formar uma pasta.

Uma representação do preparo de amostra proposto neste trabalho foi apresentada na Figura 3. Em tubo de polipropileno (50 mL) foi pesado $2,0 \pm 0,1 \text{ g}$ da amostra e adicionado 10 mL de água. Em seguida a solução foi homogeneizada em agitador mecânico tipo vórtex (modelo VX-38-BI da Ionlab, Araucária, PR, Brasil) por aproximadamente 30 s e centrifugada (modelo Megafure 40 da Thermo Scientific,

Alemanha) por 10 min (4000 rpm/ 4°C). Na sequência, foi realizado o processo de limpeza, onde 100 µL do sobrenadante foi transferido para tubo de microcentrífuga de 2 mL e adicionado 400 µL de acetonitrila 50% (H₂O:Acetonitrila, v/v). Essa solução foi centrifugada (modelo Fresco 17 da Thermo Scientific, Alemanha) por 10 min (4000 rpm/ 4°C) e o extrato foi diluído na proporção 9:1 (v/v) com P.I. (ácido glioxílico, 15 mg L⁻¹), para posterior injeção em sistema EC. Durante o preparo foi utilizado uma micropipeta para auxiliar na transferência dos volumes entre os tubos que continham a amostra.

Figura 3. Representação do preparo de amostra proposto.



Fonte: Próprio autor.

5.4 Instrumentação e condições de separação

Foi utilizado um sistema de EC, modelo 7100 (Agilent Technologies, Alemanha), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD). Antes do primeiro uso no equipamento, o capilar foi condicionado com NaOH 1,0 mol L⁻¹ e água ultrapura, ambos por 30 min cada.

No início de cada dia de trabalho o capilar foi condicionado com NaOH 1,0 mol L⁻¹ (15 min), água ultrapura (15 min) e solução de eletrólito de corrida (BGE, do inglês *background electrolyte*) (30 min), sendo que, ao final de cada dia a lavagem foi com NaOH 1,0 mol L⁻¹ (15 min) e água ultrapura (15 min). Para aquisição e tratamento dos dados foi utilizado o *software HP ChemStation*[®].

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ESTÁGIO

6.1 Otimização das condições experimentais da técnica e do eletrólito de corrida

A otimização do método para determinação dos ácidos acético e propiônico por EC foi realizada a partir das condições de um método desenvolvido por Brugnerotto et al. ⁴, além da utilização do software Peakmaster® (versão 5.4). Anteriormente, Brugnerotto et al. ⁴ validou um método indireto por EC para determinar simultaneamente 14 ácidos orgânicos alifáticos em méis, com tempo de análise de aproximadamente 9 min. Além disso, as demais condições empregadas pelos autores foram: eletrólito de corrida (BGE do inglês, *Background Electrolyte*) composto por ácido ftálico (20 mmol L⁻¹), TRIS (14 mmol L⁻¹), CTAB (1,6 mmol L⁻¹) e cloreto de cálcio (1 mmol L⁻¹), pH 3,3; capilar de sílica fundida com 60,5 cm de comprimento total, 52 cm comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno; injeções hidrodinâmicas a 50 mbar/3 s com lavagens entre corridas de 120 s, tensão de separação de -15 kV e temperatura de 20 °C; aquisição do sinal em 230 nm e uso de padrão interno (P.I.) ácido glioxílico para corrigir pequenos erros de injeção. Nesse estudo, as alterações visaram desenvolver um método de análise de rotina mais rápido, bem como minimizar custos de compra de padrões analíticos e conseqüentemente a utilização de analitos não necessários para o objetivo pretendido. As condições otimizadas e aplicadas neste trabalho foram: BGE composto por ácido ftálico (10 mmol L⁻¹), TRIS (19 mmol L⁻¹), CTAB (0,6 mmol L⁻¹), pH 6,1, injeção 50 mbar/3 s, -20 kV, 40 cm (31,5 cm × 75 µm), 20 °C, detecção indireta em 230 nm. A otimização dos valores e das condições instrumentais serão apresentadas e discutidas nesta seção.

A separação dos analitos dentro do capilar ocorre principalmente pelas suas diferenças de mobilidade, que conseqüentemente evita a co-migração dos mesmos. Essa característica é proveniente da geração de um campo eletromagnético dentro do capilar que proporciona o deslocamento de cada analito de acordo com sua mobilidade efetiva ⁶. Portanto, a escolha do pH de separação é considerada um dos primeiros parâmetros a serem definidos na otimização do método, e isso é realizado a partir de valores de pKa e mobilidades eletroforéticas de cada analito. Como característica essencial de uma otimização, também é recomendado a escolha de um padrão interno, porém, como o ácido glioxílico atende todos os requisitos, o mesmo foi empregado como P.I. nesse estudo. Contudo, para obter a mobilidade efetiva dos

analitos de interesse foram empregadas as equações 1, 2 e 3. Os valores de pKa dos ácidos acético, propiônico e glioxílico (4,76; 4,87 e 3,33 respectivamente), bem como as mobilidades eletroforéticas destes analitos, as quais são de $42,40 \times 10^{-9}$; $37,10 \times 10^{-9}$ e $39,6 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para acético, propiônico e glioxílico, respectivamente, foram retiradas do bando de dados do Peakmaster®.

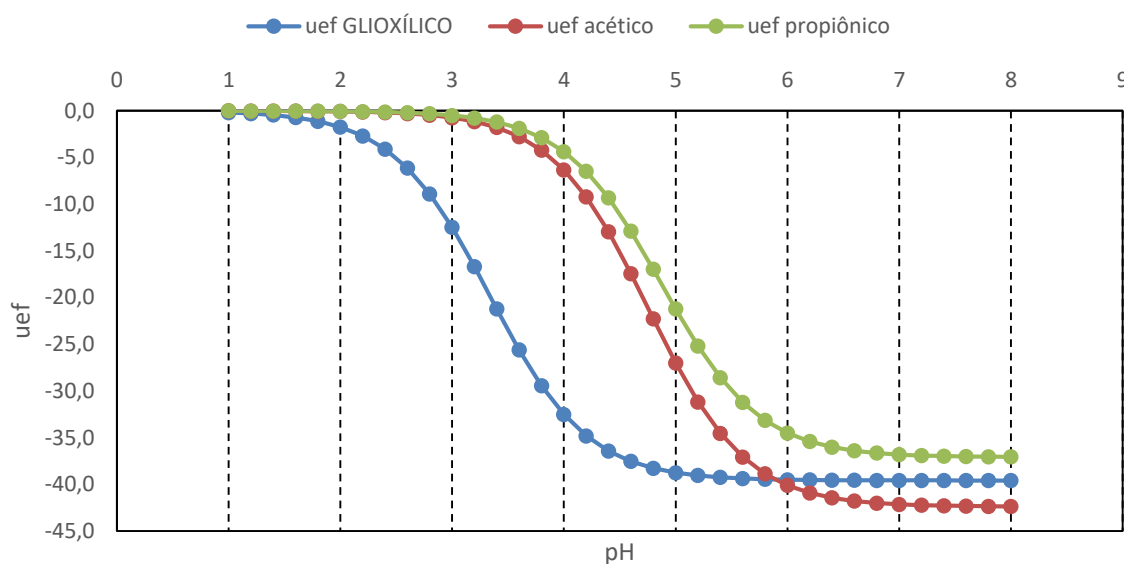
$$pH = -\log [H^+] \quad \text{Equação 1}$$

$$\alpha = \frac{ka}{ka+[H^+]} \quad \text{Equação 2}$$

$$\mu_{eff} = \alpha \times \mu_{el} \quad \text{Equação 3}$$

Sendo μ_{el} a mobilidade eletroforética e α o grau de ionização de cada molécula. A partir dos resultados obtidos das equações, foi construída uma curva de mobilidade efetiva dos analitos *versus* pH, conforme observado na Figura 4.

Figura 4. Curva de mobilidade efetiva *versus* pH para os ácidos acético, propiônico e glioxílico.



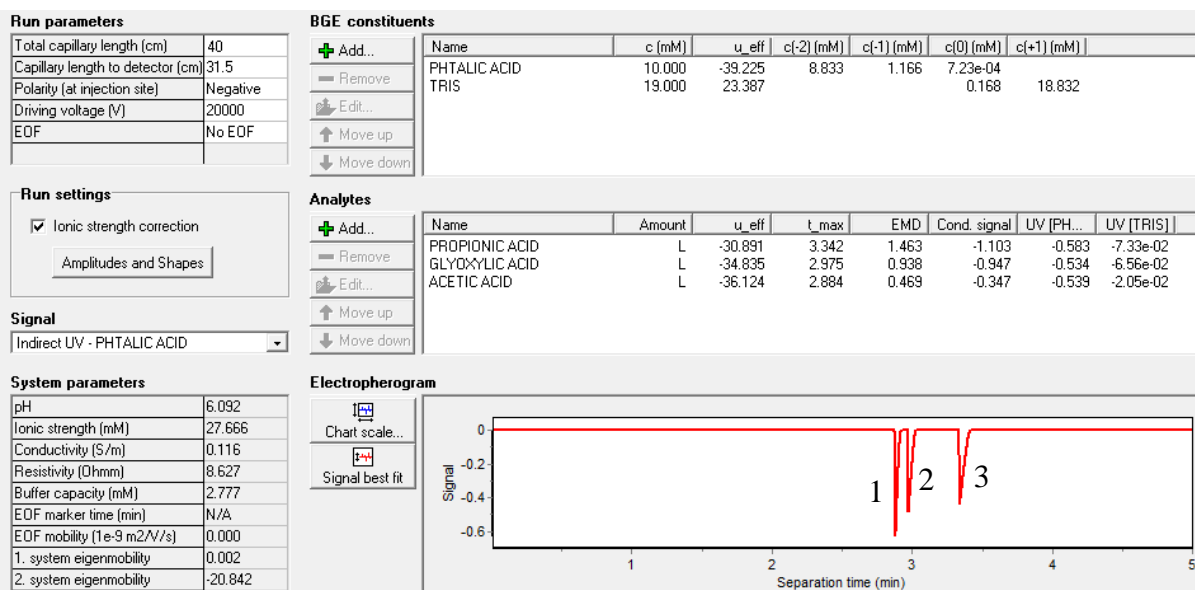
Fonte: Próprio autor.

Considerando a faixa de pH investigada, conforme observado na Figura 4, a partir de pH 4,0 já poderia ocorrer separação entre os analitos uma vez que há uma diferença de mobilidade efetiva. No entanto, a mobilidade efetiva desses compostos

ainda é considerada baixa e, portanto, demorariam mais tempo para chegar ao detector. Nesse sentido, a partir de pH 6,0 poderia ser considerada uma faixa de pH ideal.

Nesse trabalho para as simulações foi considerado um capilar de sílica fundida com os seguintes tamanhos: 40 cm de comprimento total, 31,5 de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno. O comprimento efetivo corresponde à extremidade mais longa em que os ácidos acético e propiônico são introduzidos no capilar. Com relação aos componentes e suas concentrações do BGE, o cloreto de cálcio foi proposto como um aditivo com objetivo de alterar a mobilidade efetiva e promover a separação dos ácidos láctico e glucônico ⁴. Entretanto, como esses compostos não fizeram parte do escopo de interesse, o cloreto de cálcio não foi utilizado no BGE. O ácido ftálico continuou sendo o co-íon, porém sua concentração foi alterada de 20 para 10 mmol L^{-1} e conseqüentemente, para obter o pH desejado para a separação, a concentração de TRIS também foi alterada de 14 para 19 mmol L^{-1} . Portanto o contra-íon também continuou sendo o TRIS, porém a escolha da sua concentração foi estabelecida a partir de simulações no Peakmaster®, a qual variou de 8 a 21 mmol L^{-1} (intervalos de 1 mmol L^{-1}). Como o método irá monitorar apenas dois analitos, também foi recomendado que o P.I. ficasse entre os ácidos acético e propiônico. Portanto, a melhor condição de separação e que atendeu aos requisitos inicialmente recomendados está representado na Figura 5. A partir das informações reportadas para a Figura 4, foi observado (Figura 5) que a melhor separação resultou em valor de pH (6,09). Ainda, também foi observado picos simétricos (sem caudas ou deformações) o que pode ser resultado dos valores da dispersão por eletromigração próximos de zero.

Figura 5. Representação da interface do Peakmaster® com condições previamente otimizadas e a separação do 1 - ácido acético, 2 – ácido glicóxico (padrão interno); 3 - ácido propiônico.



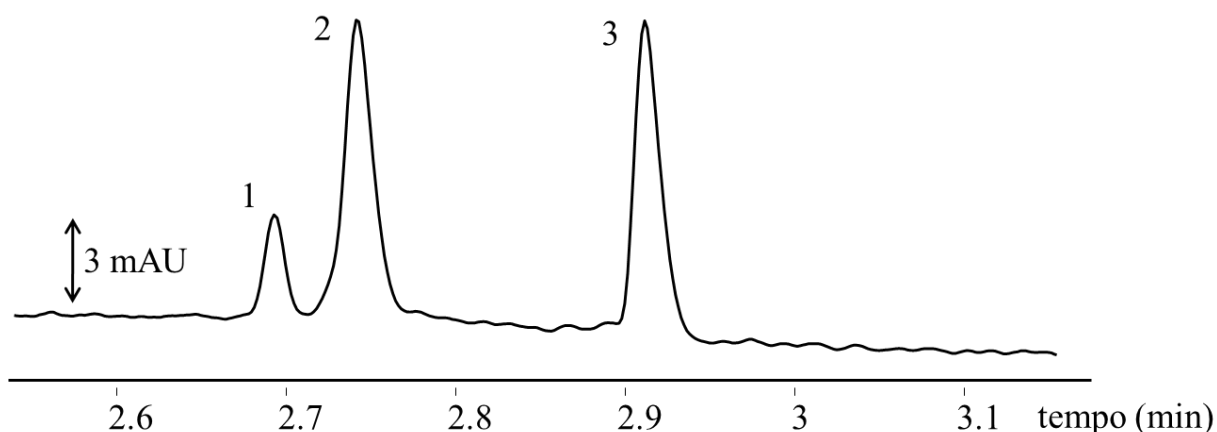
Fonte: Próprio autor.

A força iônica é uma medida da concentração total de íons em solução e o seu aumento pode resultar no surgimento do efeito Joule, devido ao maior fluxo de corrente dentro do capilar¹⁰. Não há indicação ou recomendação de valores de força iônica que possam prevenir esse efeito, porém sabe-se que o aumento da corrente pode levar a depleção do BGE por meio da eletrólise, sendo necessário uma reposição mais frequente do BGE. Portanto, considerando o valor de força iônica obtido para esse estudo (27,66 mmol L⁻¹) é recomendado observar qualquer alteração na corrente elétrica e como uma forma de prevenção, é recomendado substituir os *vials* com BGE com frequência. Por outro lado, a aplicação de uma elevada diferença de potencial, mesmo gerando um aumento na corrente elétrica no capilar (< 100 µA), pode ser uma estratégia interessante para diminuir o tempo de análise, resultado em menor tempo de permanência dos analitos no capilar. O software não prevê a corrente elétrica que será gerada, apenas é possível considerar a tensão aplicada. Nesse trabalho, as simulações foram realizadas utilizando uma tensão de 20 KV (polaridade negativa) a qual diminui o tempo de análise para 3 min, sendo que no método de Brugnerotto et al.⁴ o tempo de análise era de aproximadamente 9 min com tensão de 15 KV (polaridade negativa).

Considerando que os ácidos acético e propiônico estão negativamente carregados porque devido aos seus pK_a s estão dissociados em solução, eles serão introduzidos no capilar pela extremidade catódica (negativa). Devido a isso, a polaridade na injeção bem como o EOF será invertida, para que ambos - EOF e analitos - migrem na mesma direção e que seja possível uma detecção em menor tempo devido a soma das mobilidades vetoriais. A polaridade pode ser invertida pelo Peakmaster® (Figura 5) e também no software de aquisição de dados acoplado a EC por meio da inserção de um sinal negativo (-) junto do valor da tensão que será aplicada, em contrapartida, o EOF pode ser invertido apenas experimentalmente. No método desenvolvido anteriormente ⁴ foi utilizado $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB, um surfactante catiônico. Nesse estudo, por meio de algumas injeções experimentais para avaliar na prática toda a otimização realizada pelo Peakmaster®, optou-se por utilizar $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB. Desse modo, com o objetivo de verificar se as informações obtidas por meio das simulações no PeakMaster® estavam de acordo com o que ocorreria experimentalmente, foi realizada uma análise experimental utilizando as condições selecionadas e o resultado pode ser observado na Figura 6.

Figura 6. Eletroferograma da separação do (1) acético (2 mg L^{-1}), (2) padrão interno (ácido glioxílico, 15 mg L^{-1}) e (3) propiônico (10 mg L^{-1}) em solução aquosa.

Legenda: Ácido ftálico (10 mmol L^{-1}), TRIS (19 mmol L^{-1}), CTAB ($0,6 \text{ mmol L}^{-1}$), pH 6,1, injeção 50 mbar/3 s, -20 kV, 40 cm ($31,5 \text{ cm} \times 75 \text{ } \mu\text{m}$), $20 \text{ }^\circ\text{C}$, detecção indireta em 230 nm.



Fonte: Próprio autor.

O resultado obtido experimentalmente foi muito similar ao teórico. Além disso, alguns parâmetros inerentes a técnica, tais como, temperatura (20 °C), pressão e tempo de injeção (50 mbar/3 s) seguiram as condições originais ⁴, enquanto o tempo de lavagem entre corridas com BGE passou de 120 s para 90 s pois testes prévios não apresentaram diferenças que pudessem justificar um tempo maior de lavagem (dados não mostrados) e/ou alterações no perfil das separações.

6.2 Seletividade teórica

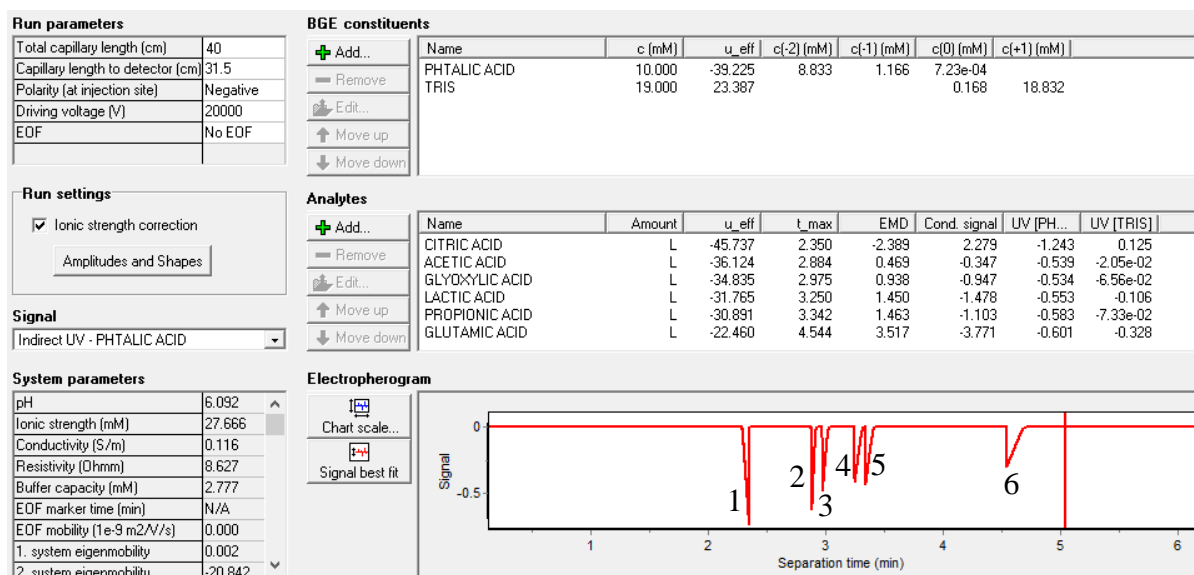
É importante verificar a capacidade de um método não somente em detectar diversos analitos, mas na eficiência de distinguir os analitos de interesse na presença de outros interferentes ^{23,24}, principalmente em matrizes complexas, como os produtos cárneos ²⁵. Este tipo de estudo é denominado avaliação da seletividade de um método analítico.

De acordo com a RDC nº 272, de 14 de março de 2019, além dos aditivos de interesse a serem monitorados nesse método, em amostras industrializadas cozidas também podem ser utilizados os ácidos cítrico, láctico e glutâmico, porém para estes não há limite estabelecido, apenas são indicados em “quantidade suficiente para” (q.s.p.). Mesmo que não seja estabelecido um limite, esses analitos podem ser qualitativamente detectados se o método fornecer características passíveis de identificação, seja pelas condições experimentais ou pelo método de extração.

Portanto, devido as alterações nas condições de separação do método descrito por Brugnerotto et al. ⁴ e a fim de verificar se os ácidos cítrico, láctico e glutâmico poderiam agir como possíveis compostos interferentes, esses analitos foram incluídos na simulação de separação no Peakmaster[®], conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7. Seletividade do método proposto simulada no Peakmaster®.

Legenda: 1 - ácido cítrico; 2 - ácido acético; 3 - ácido glioxílico (padrão interno); 4 - ácido láctico; 5 - ácido propiônico; 6 - ácido glutâmico.



Fonte: Próprio autor.

A partir das condições proposta nesta simulação (Figura 7), nenhum dos analitos interferiu na separação, demonstrando que, teoricamente o método pode ser seletivo na presença de ácido cítrico, láctico e glutâmico.

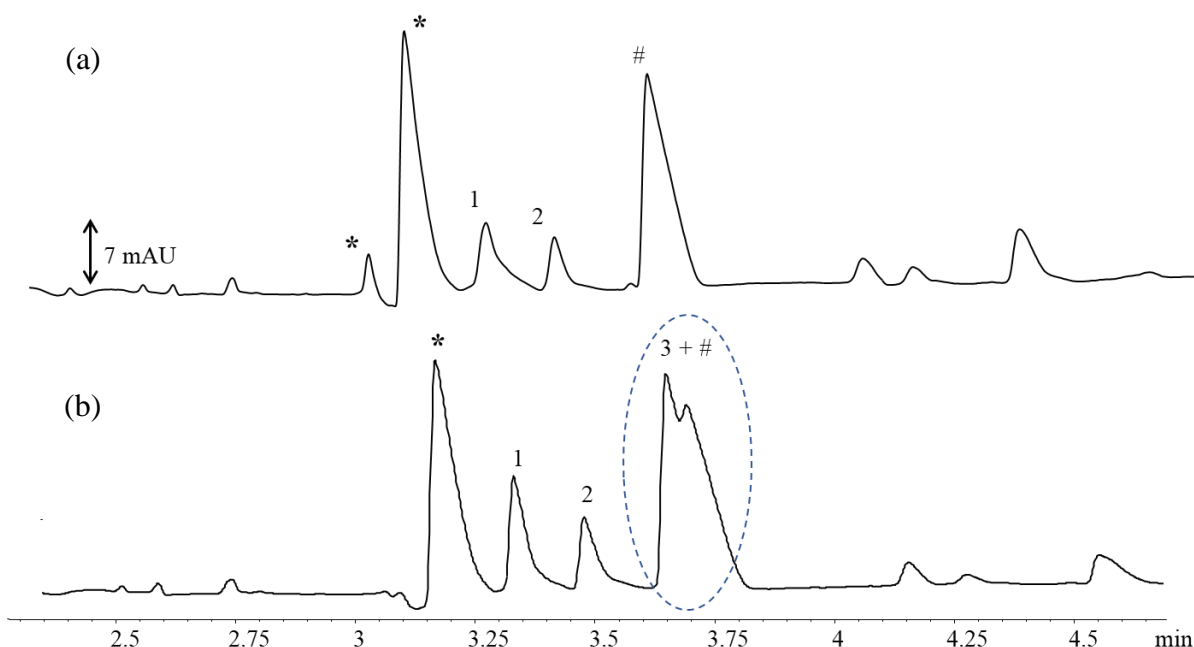
6.3 Avaliação qualitativa

Após a otimização das condições experimentais e da aplicação do preparo de amostras proposto nesse trabalho, o sistema de EC foi utilizado para realização das análises qualitativas. Na figura 8 foi apresentado os eletroferogramas da separação de uma solução contendo os analitos de interesse (seção 5.2) e da amostra (seção 5.3). De acordo com a Figura 8, além dos analitos de interesse, outros dois compostos também foram visualmente observados, sendo um deles agindo como interferente. Considerando a simulação dos compostos interferentes (Figura 7, seção 6.2), que demonstrou que antes da migração dos ácidos acético e propiônico ocorre a migração dos ácidos cítrico e láctico, respectivamente, e comparando com o perfil de separação observado na Figura 8, há um indicativo de que estes ácidos (cítrico e láctico) estejam presentes na amostra analisada. Além disso, de acordo com a lista de ingredientes da amostra analisada, os ácidos cítrico e láctico foram empregados como aditivos,

deixando ainda mais evidente de que eles foram extraídos no preparo de amostras e detectados sob as condições experimentais empregadas nesse estudo.

Figura 8. Eletroferograma da separação da (a) amostra e da (b) amostra com solução dos analitos (10,0; 50,0 e 15 mg L⁻¹ de acético, propiônico e glioxílico, respectivamente). Condições de separação: ácido ftálico (10 mmol L⁻¹), TRIS (19 mmol L⁻¹), CTAB (0,6 mmol L⁻¹), pH 6,1, injeção 50 mbar/3 s, -20 kV, 40 cm (31,5 cm × 75 μm), 20 °C, detecção indireta em 230 nm.

Legenda: * - desconhecido; 1 - ácido acético; 2 - ácido glioxílico (padrão interno); # - suspeita de comigração de analitos; 3 + # - comigração de analitos (lático + propiônico).



Fonte: Próprio autor.

Outro resultado interessante foi observando quanto à similaridade de separação entre as simulações do Peakmaster® e as obtidas experimentalmente no sistema de EC. No entanto, conforme observado a Figura 8b, que representa uma separação que contém os analitos de interesse em uma solução de concentração conhecida juntamente com a amostra, ocorreu uma comigração do ácido propiônico com, provavelmente, o ácido lático. Portanto, alguns parâmetros da otimização do método precisarão ser revisados e alterados para evitar a comigração desses compostos.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A utilização do software Peakmaster® possibilitou simular alterações na composição e concentração dos componentes do eletrólito de corrida, bem como de alguns parâmetros inerentes a técnica de EC. Uma das principais vantagens do uso foi em evitar que na prática ocorresse uma alta geração de resíduos químicos. As simulações também apresentaram uma grande similaridade com os eletroferogramas obtidos experimentalmente na eletroforese capilar, com tempo de análise inferior ao método da literatura e, até o momento, o preparo de amostra proposto também demonstrou ser adequado para a extração dos analitos.

Para dar continuidade ao trabalho proposto, são recomendadas algumas ponderações, sendo elas:

- Para evitar que ocorra a comigração, é recomendado alterar as concentrações de ftálico ou de TRIS, a qual irá causar uma alteração no pH e conseqüentemente na mobilidade efetiva dos analitos;
- Validar o método proposto por meio dos parâmetros de validação: linearidade, efeito de matriz e recuperação;
- Aplicar o método validado em um número maior de amostras para que os dados exploratórios desse estudo possam se tornar mais conclusivos;
- Aplicar o método validado em diferentes produtos cárneos

8. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL

O estágio supervisionado é uma atividade complementar para formação profissional de um aluno de graduação e é um preparo inicial para ingressar no mercado de trabalho. Também é uma oportunidade de crescimento profissional e um momento em que, ao mesmo tempo, se compartilha e se adquire experiências.

Estagiar em um laboratório que atende aos requisitos de qualidade analítica estabelecidos internacionalmente, conviver com os profissionais experientes da SLAV/SC e acompanhar a rotina das análises de fiscalização de alimentos foi uma oportunidade única e enriquecedora. Essa rotina também proporcionou uma visão mais ampla da atuação dos profissionais da área de química em análises fiscais e de rotina em alimentos, bem como, da importância de ter métodos analíticos validados e robustos para serem aplicados em cada caso. As experiências mais desafiadoras, as quais exigem soluções ou tomadas de decisões baseadas em ferramentas disponíveis, também contribuem igualmente para formação profissional.

9. REFERÊNCIAS

- ¹ BRASIL. RDC Nº 272, DE 14 DE MARÇO DE 2019. *Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento*. 2019, pp 1–38.
- ² Maier, E.; Kurz, K.; Jenny, M.; Schennach, H.; Ueberall, F.; Fuchs, D. Food Preservatives Sodium Benzoate and Propionic Acid and Colorant Curcumin Suppress Th1-Type Immune Response in Vitro. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48* (7), 1950–1956. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.042>.
- ³ Mani-López, E.; García, H. S.; López-Malo, A. Organic Acids as Antimicrobials to Control Salmonella in Meat and Poultry Products. *Food Res. Int.* **2012**, *45* (2), 713–721. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>.
- ⁴ Brugnerotto, P.; Della Betta, F.; Gonzaga, L. V.; Fett, R.; Oliveira Costa, A. C. A Capillary Electrophoresis Method to Determine Aliphatic Organic Acids in Bracatinga Honeydew Honey and Floral Honey. *J. Food Compos. Anal.* **2019**, *82*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103243>.
- ⁵ Jager, A. V.; Tavares, M. F. M. Determinação Simultânea de Cátions Por Eletroforese Capilar: Fundamentos e Aplicações. *Quim. Nova* **2001**, *24* (3), 363–373.
- ⁶ Tavares, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. *Quim. Nova* **1995**, *19* (2), 173–181.
- ⁷ Da Silva, J. A. F.; Coltro, W. K. T.; Carrilho, E.; Tavares, M. F. M. Terminologia Para as Técnicas Analíticas de Eletromigração Em Capilares. *Quim. Nova* **2007**, *30* (3), 740–744. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300040>.
- ⁸ Whatley, H. Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis. *Clin. Forensic Appl. Capill. Electrophor.* **2001**, 21–58. <https://doi.org/10.1007/978-1-59259-120-6>.
- ⁹ Colombara, R.; Tavares, M. F. M.; Massarro, S. Determinação Simultânea de Ânions Por Eletroforese Capilar: Características e Aplicações. *Quim. Nova* **1997**, *20* (5), 512–518.
- ¹⁰ Landers, J. P. *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*; 2008.
- ¹¹ Tavares, M. F. M. Mecanismos de Separação Em Eletroforese Capilar. *Quim. Nova* **1997**, *20* (5), 493–511.

- ¹² Costa, A. C. O. Metodologias Para Determinação de Fármacos, Seus Metabólitos e Desreguladores Endócrinos Em Águas Brutas Voltadas Ao Abastecimento Público Utilizando Técnicas de Separação Em Meio Líquido (CE/UV, CE-MS, LC-MS/MS)., Universidade de São Paulo, 2009.
- ¹³ Spudeit, D. A.; Dolzan, M. D.; Micke, G. A. Conceitos Básicos Em Eletroforese Capilar. *Sci. Chromatogr.* **2012**, *4* (4), 287–297. <https://doi.org/10.4322/sc.2012.017>.
- ¹⁴ Gonçalves, S.; Alves, V. R.; Pérez, S. O.; Ferreira, M.; Daguer, H.; de Oliveira, M. A. L.; Micke, G. A.; Vitali, L. Rapid Method for the Determination of Citrate, Phosphate and Sulfite in Seafood by Capillary Zone Electrophoresis. *Food Chem.* **2020**, *321* (March), 126705. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126705>.
- ¹⁵ Della Betta, F.; Siqueira, M. A.; Vitali, L.; Fett, R.; Oliveira Costa, A. C. Assessment of Nitrate, Nitrite, Bromate and Bromide Levels in Beer from Different Styles and Origins. *J. Food Compos. Anal.* **2019**, *79* (March), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.03.013>.
- ¹⁶ da Silva, M.; Fernandes Sako, A. V.; Micke, G. A.; Vitali, L. A Rapid Method for Simultaneous Determination of Nitrate, Nitrite and Thiocyanate in Milk by CZE-UV Using Quaternary Ammonium Chitosan as Electroosmotic Flow Inverter. *J. Food Compos. Anal.* **2020**, *88* (August 2019), 103455. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103455>.
- ¹⁷ Du, B.; Zhang, J.; Dong, Y.; Wang, J.; Lei, L.; Shi, R. Determination of Testosterone/Epitestosterone Concentration Ratio in Human Urine by Capillary Electrophoresis. *Steroids* **2020**, *161* (June), 108691. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108691>.
- ¹⁸ Vaz, F. A. S.; De Oliveira, C. L. M.; De Oliveira, M. A. L. Fundamentos de Eletroforese Capilar: Uma Abordagem Por Animações. *Quim. Nova* **2015**, *38* (5), 732–737. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150065>.
- ¹⁹ Kalaycıoğlu, Z.; Kaygusuz, H.; Döker, S.; Kolaylı, S.; Erim, F. B. Characterization of Turkish Honeybee Pollens by Principal Component Analysis Based on Their Individual Organic Acids, Sugars, Minerals, and Antioxidant Activities. *LWT - Food Sci. Technol.* **2017**, *84*, 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.003>.
- ²⁰ Navarro-Pascual-Ahuir, M.; Lerma-García, M. J.; Simó-Alfonso, E. F.; Herrero-

Martínez, J. M. Analysis of Aliphatic Organic Acids in Commercial Fruit Juices by Capillary Electrophoresis with Indirect UV Detection: Application to Differentiation of Fruit Juices. *Food Anal. Methods* **2017**, *10* (12), 3991–4002. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0963-6>.

²¹ Adımcılar, V.; Öztekin, N.; Bedia Erim, F. A Direct and Sensitive Analysis Method for Biogenic Amines in Dairy Products by Capillary Electrophoresis Coupled with Contactless Conductivity Detection. *Food Anal. Methods* **2018**, *11* (5), 1374–1379. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1122-9>.

²² Gaš, B.; Jaroš, M.; Hruška, V.; Zuskova, I.; Štědrý, M. PeakMaster - A Freeware Simulator of Capillary Zone Electrophoresis. *LC-GC Eur.* **2005**, *18* (5), 282–288.

²³ Inmetro. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos - DOQ-CGCRE-008. http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf. 2016, p 31.

²⁴ Bruce, P.; Minkkinen, P.; Riekkola, M.-L. Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method. *Mikrochim. Acta* **1998**, *128* (1–2), 93–106. <https://doi.org/10.1007/BF01242196>.

²⁵ Della Betta, F.; Pereira, L. M.; Siqueira, M. A.; Valese, A. C.; Daguer, H.; Fett, R.; Vitali, L.; Costa, A. C. O. A Sub-Minute CZE Method to Determine Nitrate and Nitrite in Meat Products: An Alternative for Routine Analysis. *Meat Sci.* **2016**, *119*, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.011>.