



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO



**Avaliação da exposição humana às aminas heterocíclicas
aromáticas presentes em alimentos cárneos**

Thayná Francisquelli Zanin

**Ribeirão Preto
2023**

THAYNÁ FRANCISQUELLI ZANIN

**Avaliação da exposição humana às aminas heterocíclicas
aromáticas presentes em alimentos cárneos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Vincenzi Jager

**Ribeirão Preto
2023**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Zanin, Thayná Franscisquelli
Zanin, T.F.

Avaliação da exposição humana às aminas heterocíclicas aromáticas presentes em alimentos cárneos.
Ribeirão Preto: FCFRP, 2023.

Número de páginas: 81p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Vincenzi Jager

1. Aminas heterocíclicas aromáticas; Cromatografia líquida; Carne bovina; Carne de frango; Exposição humana

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Thayná Francisquelli Zanin

Título do trabalho: Avaliação da exposição humana às aminas heterocíclicas aromáticas presentes em alimentos cárneos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus que me possibilitou essa realização e me deu forças para concluir esse sonho.

Em seguida gostaria de agradecer ao Professora Dra. Alessandra Vincenzi Jager, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho, obrigada pelo convívio, pela compreensão, pelo apoio e pela amizade. E a todos funcionários e alunos do laboratório de Ciências Farmacêuticas e do programa de Toxicologia, de maneira especial a Izabela Guerra e a Maria Victória Vicente que compartilharam várias etapas desse projeto comigo, sem elas esse resultado não seria possível. Agradeço também todos os Mestres e Doutores que ministraram as aulas durante esse período, por todo conhecimento que me transmitiram, contribuindo imensamente com a minha bagagem acadêmica.

À minha família, por acreditarem em mim. À minha mãe Denise por todo seu cuidado e dedicação que me deram forças para seguir nos momentos de angústia. Ao meu pai Clóvis pela sua presença e por me mostrar que nunca estive sozinha nessa caminhada. Ao meu irmão Gabriel por todo amor e carinho e minha avó Haydée que cuidou de mim todos esses anos com muito amor e zelo.

Ao meu noivo Vicente que esteve ao meu lado. Obrigada pelo carinho, paciência, e pela compreensão em cada etapa, sua cumplicidade e amor foram essências para me mostrar que não estava sozinha.

A minha amiga e irmã Tamyris, obrigada pela amizade de todos esses anos e por sempre acreditar em mim.

Ao Prof. Dr. Carlos A.F. de Oliveira pela oportunidade de realizar as análises cromatográficas no Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos da FZEA-USP.

E por fim gostaria de agradecer ao Programa de Toxicologia da Universidade de São Paulo, e as pessoas que convivi ao longo desses anos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento e Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Projeto Pesquisa Regular FAPESP (Processo 2016/09794-8).

“ O futuro pertence àqueles que
acreditam na beleza de seus sonhos. ”

Eleanor Roosevelt

RESUMO

ZANIN, Thayná Francisquelli. **Evaluation of human exposure to aromatic heterocyclic amines present in meat foods.** 2023. 81f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

As aminas heterocíclicas aromáticas (AHAs) podem estar presentes em carnes cozidas, e são formadas via reação de Maillard tendo como precursores a creatina, creatinina, amino ácidos e açúcares. As mais comuns são a 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina (IQ), 2-amino-3-metilimidazo [4,5-f] quinoxilina (IQx), 2-amino-3,4-dimetilimidazo [4,5-f] quinolina (MeIQ), 2-amino-3,8-dimetilimidazo [4,5-f] quinoxilina (MeIQx), 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo [4,5-f]quinoxalina (4,8– DiMeIQx) e 2-amino-1metil-6-fenilimidazo [4,5- b] piridina (PhIP). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classifica a IQ como provável carcinógeno para humanos (Grupo 2A), a MeIQ, MeIQx e PhIP como possível carcinógeno para humanos (Grupo 2B). Este trabalho teve como objetivo avaliar a incidência de IQ, IQx, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx e PhIP em alimentos prontos para o consumo preparados com carnes bovina e frango, com a finalidade de determinar os níveis de exposição da população da cidade de Ribeirão Preto a estes compostos através da ingestão dos alimentos selecionados. Voluntários (n=386) acima de 18 anos de idade responderam um Questionário Quantitativo de Frequência Alimentar (QQFCA) e cem amostras (n=100) foram coletadas em restaurantes locais, sendo vinte e cinco amostras de cada tipo: filé bovino grelhado na chapa, filé bovino grelhado na brasa, filé de frango grelhado na chapa e filé de frango empanado e frito. As concentrações das AHA foram determinadas por um método analítico empregando a Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplado ao Espectrômetro de Massas (LC-MS/MS). As somatórias das concentrações das AHA variaram entre <LOD - 15,7 ng.g⁻¹ e <LOD - 0,43 ng.g⁻¹, para os filés de frango grelhados e empanados, respectivamente. Nas amostras de filés de carne bovina, os valores variaram entre <LOD -7,1 ng.g⁻¹ e <LOD - 1,3 ng. g⁻¹, para aqueles preparados na chapa e na brasa, respectivamente. As estimativas de ingestão de AHA variaram entre 0,20 e 2112 ng.dia⁻¹ e entre 0,0030 e 26,1 ng.kg pc⁻¹. dia⁻¹.

Palavras-chave: Aminas heterocíclicas aromáticas; Cromatografia líquida; Carne bovina; Carne de frango; Exposição humana.

ABSTRACT

ZANIN, Thayná Francisquelli. **Assessment of exposure and risk characterization associated with the consumption of polycyclic aromatic hydrocarbons present in meat foods among the adult population of the city of Ribeirão Preto, São Paulo**. 2023. 81f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Heterocyclic aromatic amines (HAA) might be present in cooked meats, and are formed via the Maillard reaction having creatine, creatinine, amino acids and sugars as precursors. The most common are 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline(IQx), 2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f]quinoline (MeIQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline (4,8 - DiMeIQx) and 2-amino-1methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). IARC classifies IQ as a probable human carcinogen (Group 2A), MeIQ, MeIQx and PhIP as a possible human carcinogen (Group 2B). This study aimed to evaluate the incidence of IQ, IQx, MeIQ, MeIQx, DiMeIQx and PhIP in ready-to-eat foods prepared with beef and chicken, with the aim of determining the levels of exposure of the population of the city of Ribeirão Preto to these compounds, through the ingestion of selected foods. Volunteers (n=386) over 18 years of age answered a Quantitative Food Frequency Questionnaire (QFFQ) and one hundred samples (n=100) were collected in local restaurants, twenty-five samples of each type: grilled beef, charcoal grilled beef, grilled chicken and breaded and fried chicken. HAA concentrations were determined by an analytical method employing Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled to a Mass Spectrometer (LC-MS/MS). The sum of HAA concentrations varied between <LOD - 15.7 ng.g⁻¹ and <LOD - 0.43 ng.g⁻¹, for grilled and breaded chicken fillets, respectively. In the beef samples, the values varied between <LOD -7.1 ng.g⁻¹ and <LOD - 1.3 ng.g⁻¹, for those prepared on charcoal and on the grill, respectively. HAA intake estimates were between 0.20 and 2112 ng.day⁻¹ and between 0.0030 and 26.1 ng.kg bw⁻¹. day⁻¹.

Keywords: Aromatic heterocyclic amines; Liquid chromatography; Beef, Chicken; Human exposure.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4,7,8-TriMeIQx	2-Azido-3,4,7,8-tetrametil-3H-imidazo[4,5-f]quinoxalina
4,8 DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo [4,5-f]quinoxalina
7,8-DiMeIQx	2-Amino-3,7,8-trimetilimidazo(4,5-f)quinoxalina
A α C	2-amino-alfaa-carbolina
MeA α C	2-amino-3-methyl-alfa-carbolina
AHA	aminas heterocíclicas aromáticas
AIA	Aminas imidazo-azarenos
Harman	1-metil-9H- pirido [4,3- b] indol
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
Norharman	9H-pirido [4,3-b]indol
Trp-P-1	3-Amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol
Trp-P-2	3-amino-1-metil-pirido(4,3-b)indol
Tri-MeIQx	2-azido-3,4,7,8-tetrametil-3H-imidazo[4,5-f]quinoxalina
CV	Coeficiente de Variação
Glu-P-1	2-amino-6-metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
CYP450	Citocromo P450
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
P95	Percentil 95
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
P50	Percentil 50
ID	Ingestão Diária
IQ	2-amino-3-metil-imidazo[4,5-f]quinolina
IQx	2-amino-3-metil-imidazo [4,5-f] quinoxilana
kgpc	Kilograma de peso corpóreo
GST	Glutathione-S-transferase
SULT	Sulfotransferase
UGT	UDP-glucuroniltransferase
NAT	N-acetiltransferase
LOD	Limite de detecção
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MeIQ	2-amino-3,4-dimetilimidazo [4,5-f] quinolina
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazo [4,5-f] quinoxilana
MS	Espectrometria de Massas
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidreto
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NSRL	Nível sem algum risco significativo
PhiP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5- b] piridina
QQFCA	Questionário Quantitativo de Frequência de Consumo Alimentar
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado hoje um dos mais respeitáveis produtores de carne bovina no mundo, sendo o segundo maior exportado e detendo o maior rebanho com 209 milhões de cabeças de gado e é segundo maior consumidor com 38,6 Kg/habitante/ano.¹

A carne de frango também é um dos alimentos mais consumidos pela população brasileira, esse fato se deve a facilidade de preparo além de sua alta disponibilidade e baixo custo. Cada brasileiro consome em média 43 Kg de carne de frango por ano, tanto na forma in natura e nas várias formas de processamento, em relação à exportação desse produto o Brasil detém o título de maior exportador.¹

A carne no geral é constituída normalmente, por água (de 60 a 80%), proteínas (de 15 a 25%) e o restante formado principalmente por gorduras, vitaminas e sais.² Quando submetemos a carne a algum tipo de processamento como cozer, grelhar ou fritar poderá haver formação de alguns compostos químicos carcinógenos como os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) e Aminas Heterocíclicas Aromáticas (AHA).³

1.1. Aminas Heterocíclicas Aromáticas

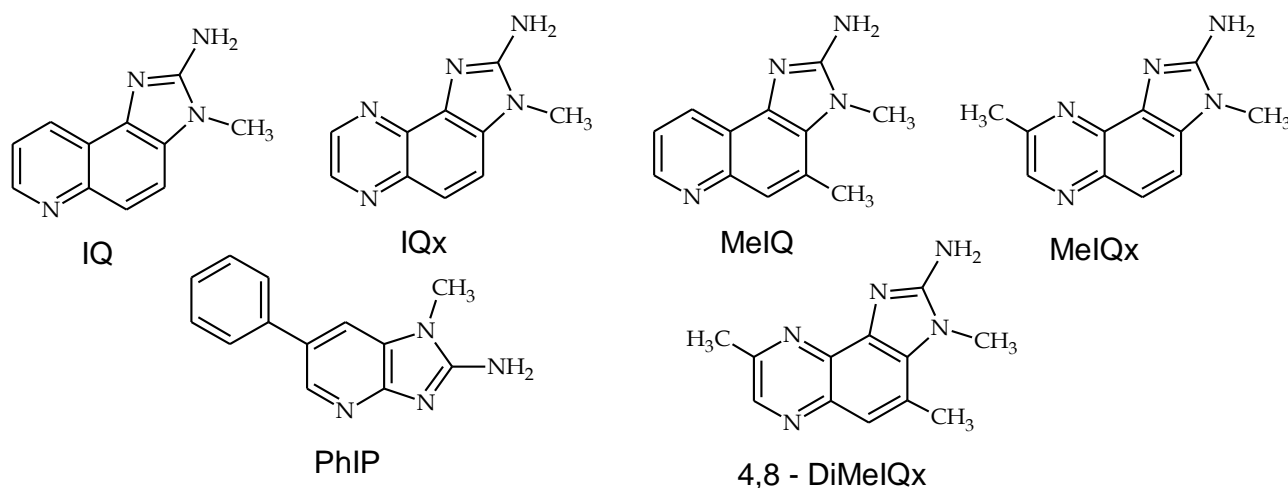
As AHA são compostas que contêm em sua estrutura de dois a cinco anéis aromáticos condensados com um ou mais átomos de nitrogênio em seu anel.⁴ As AHAs podem ser divididas em duas classes principais: amino-carbonilas ou produtos de pirólise e aminas imidazo-azarenos (AIAs).⁵ As amino-carbonilas geralmente têm um grupo amino exocíclico e às vezes também um grupo metil exocíclico ligado a um anel de piridina na porção indol ou imidazol. Os representantes desta classe são principalmente, AαC, MeAαC, Harman, Norharman, Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1 e Glu-P-2. As AIAs possuem um grupo 2-amino-imidazo e um grupo metil ligado a um dos nitrogênios no anel imidazol, entre as representantes desta classe estão a 2-amino-3-metil-imidazo[4,5-f]quinolina (IQ), 2-amino-3-metil-imidazo [4,5-f] quinoxilina (IQx), 2-amino-3,4-dimetilimidazo [4,5-f] quinolina (MeIQ), 2-amino-3,8-dimetilimidazo [4,5-f] quinoxilina (MeIQx), 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo [4,5-f]quinoxalina (4,8-DiMeIQx), 2-amino-1metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina (PhIP), 2-Amino-3,7,8-trimetilimidazo(4,5-f)quinoxalina (7,8-DiMeIQx e -Azido-3,4,7,8-tetrametil-3H-

imidazo[4,5-f]quinoxalina (4,7,8-TriMeIQx). A Figura 1 apresenta a estrutura química de algumas AHAs.²

Atualmente, em alimentos cozidos mais de 25 AHA foram detectadas, dentre elas as mais comumente encontradas são a IQ, IQx, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx e PhIP.⁶

A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou a a IQ como um provável carcinógeno para humanos (Grupo 2A), e a MeIQx, MeIQ e PhIP como possíveis carcinógenos para humanos (Grupo 2B).⁷⁸

Figura 1 - Fórmula estrutural das amins heterocíclicas aromáticas IQ, IQx, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx e PhIP



Fonte: própria autora

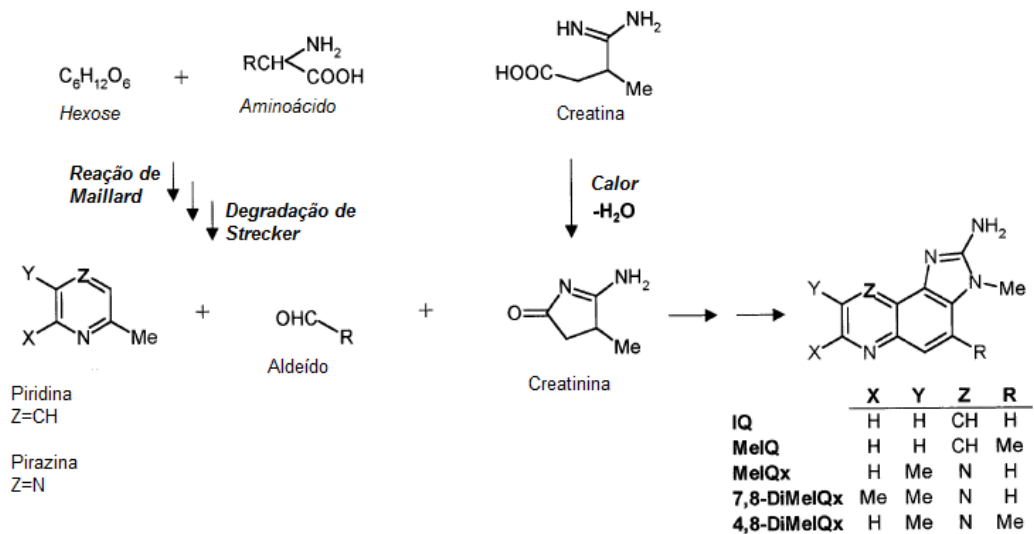
1.2. Formação das Aminas Heterocíclicas Aromáticas

As aminas heterocíclicas aromáticas são formadas a partir da reação de Maillard, uma reação não enzimática que possui como substratos proteínas ou aminoácidos livres e os açúcares. A reação de Maillard está relacionada ao sabor, cor e aroma dos alimentos, particularmente em procedimentos tradicionais, como a torrefação de café e cacau, o processo de assar de pães e bolos, e o cozimento de carne.⁹ Durante a reação de Maillard diversos produtos importantes para o valor nutricional dos alimentos são formados, entretanto, esta característica positiva pode ser reduzida pelo decréscimo da digestibilidade e formação de compostos tóxicos mutagênicos.

A reação de Maillard pode ser dividida em três etapas, na primeira uma base de Schiff é formada através da reação de condensação de uma carbonila ativa de um açúcar redutor, glicose por exemplo, com grupo amino livre de uma proteína ou de aminoácidos livres, havendo liberação de água.^{9,10} Em seguida há a ciclização da base de Schiff e a formação de glicosamida N-substituída, que é pouco estável, ocorrendo um rearranjo de Amadori e formando 1-amino-1-desoxi-2-cetose a partir de aldoses, que será degradado em compostos intermediários dependendo do pH.^{9,10} Em pH 7 ou abaixo, ocorre principalmente a 1,2-enolização com a formação de furfural, quando pentoses estão envolvidas, ou hidroximetilfurfural (HMF), quando as hexoses estão envolvidas. Em pH acima de 7, o composto de Amadori sofre principalmente 2,3-enolização, onde redutonas tal como 4-hidroxi-5-metil-2,3-dihidrofurano-3-ona (HMFone) e uma variedade de produtos de fissão, incluindo acetol, piruvaldeído e diacetil são formados. Todos esses compostos são altamente reativos e participam de outras reações, como ciclizações, desidratações, retro-aldolização, rearranjos, isomerizações e outras condensações que finalmente levam à formação de polímeros nitrogenados marrons e co-polímeros, conhecidos como melanoidinas. As melanoidinas alimentares são compostos cromóforos e aniônicos, com propriedades antioxidante, antimicrobiana, atividade prebiótica e anti-hipertensiva, que pode apresentar em sua estrutura pirrol, piridinas, piperazinas, furanos e compostos carbonílicos. O ácido fórmico e ácido acético são os dois principais produtos de degradação para a reação de Maillard que envolvem glicose e frutose, contudo, o mecanismo da reação de Maillard ainda é uma questão controversa.^{9,10}

A Figura 2 apresenta a reação de Maillard, evidenciando as estruturas químicas dos substratos e produtos na formação das AHAs, enquanto a Figura 3 representa um esquema da reação de Maillard, na qual as melanoidinas são formadas no alimento a partir de açúcar e compostos com grupamento amino (proteínas ou aminoácidos).

Figura 2 - Reação de Maillard e formação das AHAs

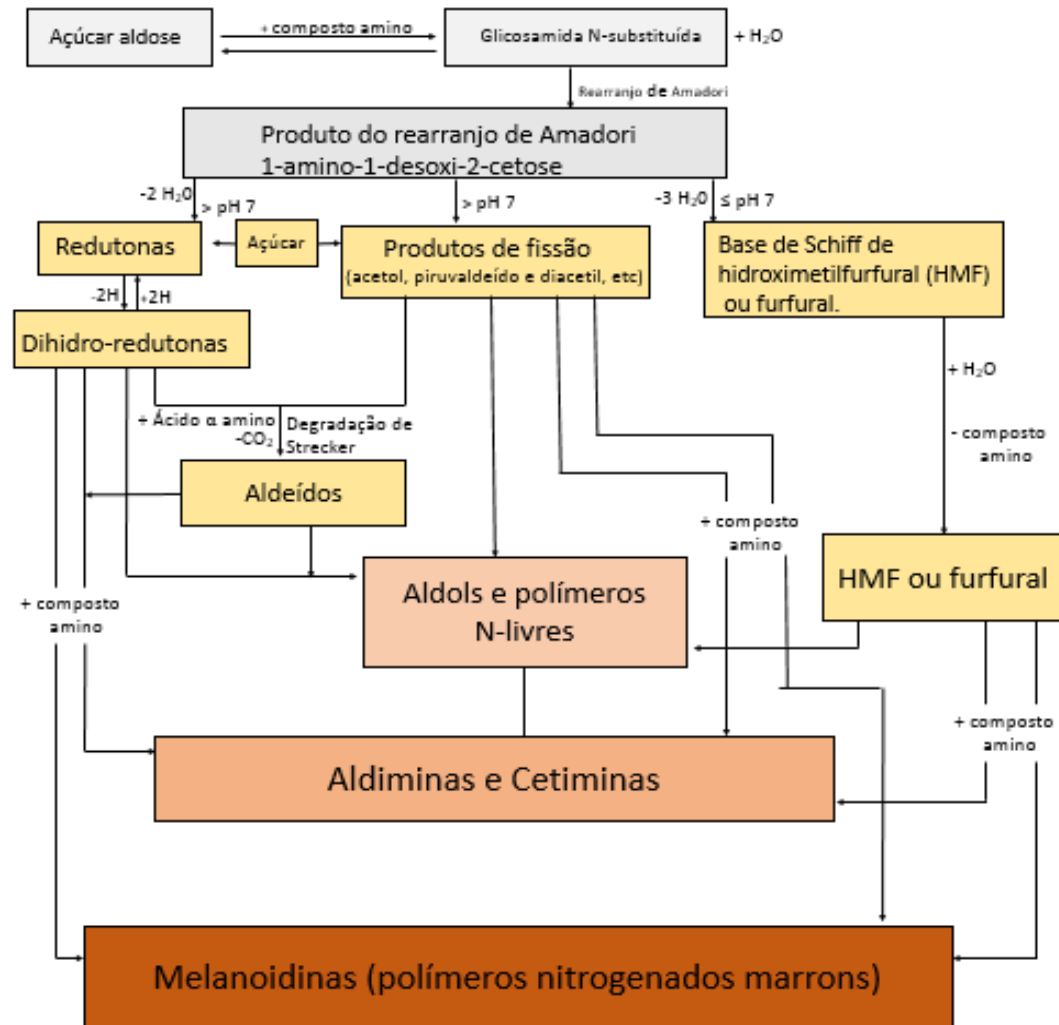


Fonte: Adaptado de Jägerstad et al. (1998).⁵

A creatina é um aminoácido que ocorre na forma de fosfato de creatina no músculo dos vertebrados e serve como reserva de energia. O aquecimento transforma a creatina em creatinina, um produto de ciclização que é fisiologicamente inerte.¹¹

Os aminoácidos livres são essenciais para a formação das AHAs, sendo que diferentes aminoácidos podem levar à formação da mesma amina. A treonina, glicina, lisina, alanina ou serina levam à formação de MelQx, enquanto a PhIP é formada a partir da fenilalanina, tirosina ou isoleucina. Em estudos com sistemas modelos, os aminoácidos treonina, alanina ou lisina participaram da formação de 4,8-DiMelQx e os aminoácidos glicina, alanina ou lisina foram responsáveis pela formação de 7,8-DiMelQx. Além da creatina, creatinina e aminoácidos, os açúcares redutores como glicose, frutose, ribose, eritrose e lactose também são necessários para a formação das AHAs, como apresentado na Figura 3.¹¹

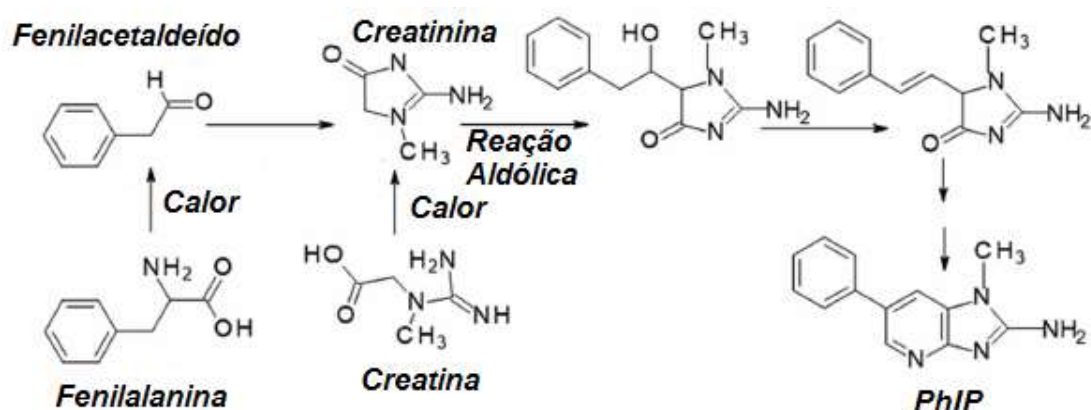
Figura 3 - Esquema da reação de Maillard



Fonte: adaptado de Martins et al.,(2000).⁹

O mecanismo de formação de PhIP foi elucidado em um modelo experimental, na qual se utilizou a fenilalanina com carbono radioativamente marcado.¹¹ Primeiramente o fenilacetaldéido é formado a partir da fenilalanina via degradação de Strecker. Em seguida, o fenilacetaldéido formado reage com a creatinina, proveniente da creatina, em uma reação aldólica, formando um produto intermediário. Por fim, ocorre uma desidratação e ciclização, havendo a formação de PhIP. A Figura 4 representa um esquema de formação da PhIP, contendo os intermediários da reação¹¹

Figura 4 - Mecanismo de formação da PhIP



Fonte: Zochling and Murkovic (2002).¹²

Além das já mencionadas concentrações dos precursores na matéria prima, a temperatura, tempo de aquecimento, o método de preparo, pH e atividade de água, assim como a presença de substâncias antioxidantes capazes de inibir a formação das aminas, também podem interferir na formação das AHA.^{9,13} Os alimentos cárneos tratados termicamente são propícios à formação das AHAs.¹⁴

Os fatores que influenciam na reação de Maillard podem ser físicos ou químicos. Os fatores físicos são tempo e temperatura de aquecimento, e a transferência de calor. Dependendo do método de preparo do alimento, o aumento do tempo e principalmente o aumento da temperatura de aquecimento contribuem com a formação de AHAs. A transferência de calor pode ser de três tipos, convecção, condução ou radiação, e a forma utilizada também poderá influenciar na quantidade de AHA formada.¹¹

Os fatores químicos que podem intervir na reação de Maillard são os teores de gordura e a oxidação lipídica do alimento. Carnes mais magras, por exemplo, apresentam maiores quantidades de precursores da reação e necessitam de maior tempo de aquecimento para serem preparadas, conseqüentemente poderão apresentar maiores níveis de AHA. As gorduras oxidadas podem gerar radicais livres que promovem a formação de AHAs.¹¹ Outro fator químico é a umidade do alimento, ou seja, quanto maior o teor de água maior a formação de AHA, isso porque água serve como meio de reação e transporte durante o aquecimento do alimento. A presença de antioxidantes e agentes redutores podem reduzir a quantidade de AHA formada, pois diminuem a oxidação lipídica e a formação de radicais livres. O efeito

inibitório na formação de AHA na presença de compostos organossulfurados, como por exemplo glutatona, L-cisteína, L-cistina e desoxialina, também já foi observado.¹⁵

1.3. Metabolismo e Toxicidade das Aminas Heterocíclicas Aromáticas

O metabolismo das AHAs pelas enzimas CYPs em animais e humanos já é bem conhecido.¹⁶ As enzimas CYPs compõem o sistema citocromo P-450, e estão intensamente ligadas às reações de biotransformação de xenobióticos (reação de fase I), que são responsáveis por transformá-los em xenobióticos mais lipofílicos. Além dessas enzimas, o citocromo P-450 é formado por outras enzimas tais como, nicodinamida adenina dinucleótido hidreto (NAPH) citocromo P-450 redutase e citocromo b5 redutase. Nesse sistema, o citocromo P-450 é a enzima terminal com afinidade pelos substratos, já a enzima Nicodinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) citocromo P-450 redutase é uma enzima intermediária, responsável pela transferência de elétrons da fonte geradora, a NADPH, para o citocromo P-450. O citocromo b5, acompanha o citocromo P-450 e funciona como opção na transferência de elétrons. Todas essas enzimas encontram-se fixas aos fosfolipídios da membrana do retículo endoplasmático.¹⁷

O citocromo P-450 é uma hemoproteína, com um átomo de ferro em seu núcleo. As isoenzimas do citocromo P-450 são representadas pela sigla CYP, seguido de um algarismo que indica a família, uma letra que representa a subfamília e um último algarismo que indica o gene. Já foram identificadas 267 famílias da CYP-450.^{17,18}

A etapa inicial da metabolização das AHAs é realizada pelo citocromo P-450 mediado pelas CYP1A1 e CPY1A2. Essas enzimas são expressas no fígado, onde há uma maior expressão da CYP1A2. Acredita-se que a ativação metabólica das AHAs ocorre exclusivamente por essa via, já nos tecidos extra-hepáticos encontramos as CYP1A1 e CYP1B1.^{19, 20, 21, 22}

No fígado ocorre a N-oxidação das aminas resultando no metabólito N-hidroxi-AHA que pode ou não se ligar ao DNA ou sofrer ação das reações de fase II.²⁰

As reações de fase II são: glucuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, e conjugação, elas complexam as moléculas de xenobióticos em moléculas sintetizadas no próprio organismo, as reações envolvem duas etapas, 1) síntese do composto endógeno que será ligado ao xenobiótico e 2) transferência do composto endógeno

para o xenobiótico, quer seja ele produto originário das reações de fase I ou não.¹⁷ Entre as enzimas de fase II temos as Glutathione-S-transferase (GST), sulfotransferase (SULT), UDP-glucuroniltransferase (UGT) e N-acetiltransferase (NAT). Muitas AHAs são dependentes de reações de fase II, portanto espera-se que tecidos que expressam essas enzimas em grandes quantidades sejam alvos potenciais para seus efeitos adversos.²³

As enzimas NAT participam da segunda fase do metabolismo de xenobióticos através de reações de acetilação. Essa enzima possui duas isoformas, NAT1 e NAT2, que são expressas de maneiras diferentes nos tecidos. A acetilação de compostos aromáticos e aminas heterocíclicas são promovidas preferencialmente pela isoforma NAT2.^{18,24} A NAT2 é amplamente expressa no fígado, enquanto a NAT1 é mais comumente encontrada em tecidos extra-hepáticos.¹⁸

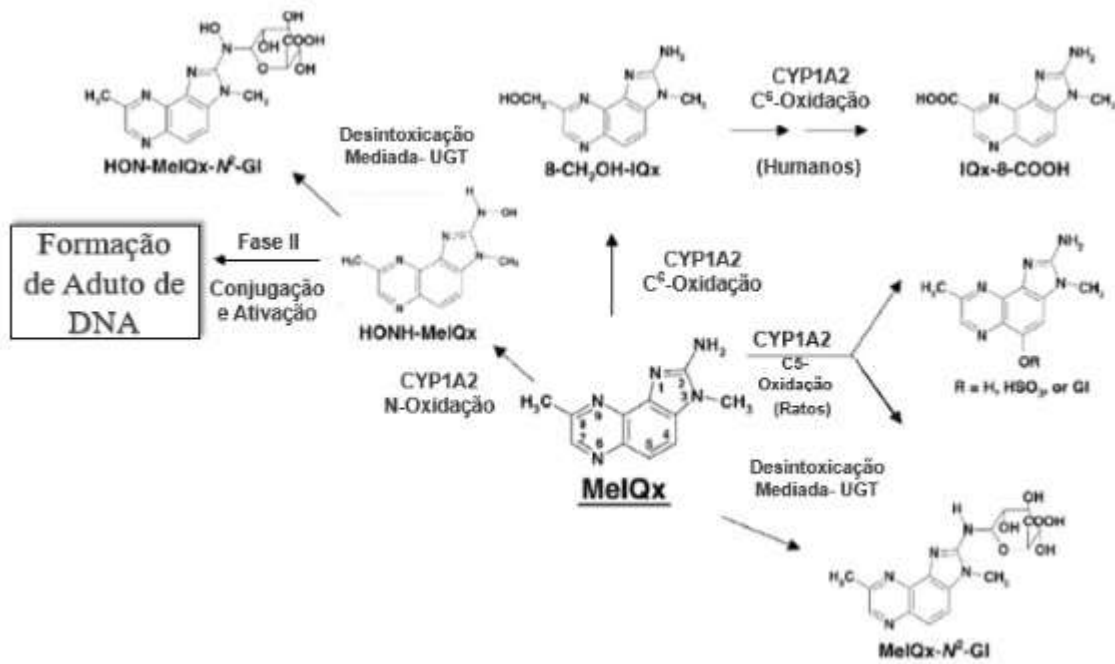
As SULTs são enzimas capazes de catalisar a transferência de um grupamento sulfúrio de uma molécula doadora, e também estão relacionadas a capacidade de bioativar ou desintoxicar aminas heterocíclicas.^{25,26} As subfamílias da enzima SULT são a SULT1A1, que é expressa principalmente no fígado, e a SULT1A2 que é expressa no intestino.^{18,26,27}

A família UGT são enzimas responsáveis pela glucuronidação de xenobióticos. Essa enzima apresenta como subfamília as UGT 1A, 2A e 2B, que estão expressas em tecidos hepáticos e extra-hepáticos.²⁷ Por fim, a enzima GST que possui papel fundamental na desintoxicação de vários xenobióticos.^{18,26} Estudos já provaram que a depleção da GST aumenta os níveis de aminas como PhIP e IQ ligadas ao ácido desoxirribonucleico (DNA), mostrando que a GST tem um papel protetor contra a genotoxicidade de algumas aminas.¹⁸

Quanto a desintoxicação das AHAs, a amina MeIQx sofre ação da enzima CYP1A2, oxidando o C8 do grupo metil formando o álcool 2-amino(8-hidroximetil)-3-metilimidazo-[4,5-f] quinoxalina (8-CH₂OH-IQx), que sofre uma segunda oxidação pela CYP1A2 para formar o ácido carboxílico 2-amino-3-metilimidazóido [4,5-f] quinoxalina-8-carboxílico (IQx-8-COOH), a formação do IQx-8-COOH é principal via de desintoxicação da MeIQx no organismo humano, além de ser o principal metabólito encontrado na urina.^{18,28} Já em ratos, o ortólogo CYP1A2 desintoxica a MeIQx através da hidroxilação C-5, mas não catalisa a formação de IQx-8-COOH.²⁹ A Figura 5 apresenta o metabolismo MeIQx.

A PhIP também sofre ação da CYP1A2 e é altamente seletiva para N-oxidação em humanos, enquanto que em ratos a CYP1A2 catalisa tanto a N-oxidação e 4'-hidroxilação do anel fenil do PhIP para produzir o produto desintoxicado, 2-amino-4'-hidroxi-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridina.¹⁸

Figura 5 - Metabolismo da MeIQx



Fonte: Adaptado Turesky et al. (2002)²⁸

Essas enzimas são as responsáveis pela ativação metabólica das AHA, formando N-hidroxi-AH que podem gerar ânions superóxidos e radicais hidroxilas, e consequentemente ocasionar também sua toxicidade.²⁷

Nos microssomas há o sistema NADPH-citocromo P-450redutase/ citocromo P-450 que gera radicais superóxidos no metabolismo de vários xenobióticos.¹⁷ Os radicais superóxidos quando sofrem ação da superóxido dismutase convertem esses radicais em peróxido de hidrogênio, além disso, os radicais superóxidos também produzem radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$) através da redução de quelatos de Fe^{3+} formando Fe^{2+} , e radicais peroxinitrito (ONOO^-) pela reação o oxigênio singlete com óxido nítrico.^{17,30} Quando o equilíbrio entre a formação de oxidantes e antioxidantes sofre um desequilíbrio, há uma perturbação na sinalização e controle redox, levando a um

processo denominado estresse oxidativo, que pode causar danos ao DNA quando não reparados.²⁷

Espécies N-hidroxi-AHA sofrerão ação das enzimas NATs e SULTs através da reação das N-hidroxi-AHAs estereficadas com o átomo C-8 da desoxiguanosina (dG), para formar adutos dG-C8-AHA, presumivelmente pelo íon nitrênio reativo como intermediário. Os adutos de DNA também podem ser formados no grupo N2 de dG e no átomo C-5 anéis aromáticos para as aminas IQ e 8-MeIQx, o que mostra o deslocamento da carga do íon nitrênio sobre os heteronúcleos.^{18,23,30,31} Aminas heterocíclicas aromáticas que contêm a porção N-metil-imidazole-2-il-amina, como é o caso da IQ e MeIQx, podem sofrer nitrosação em condições inflamatórias com óxido nítrico em condições de meio neutro e formar compostos N-nitroso-AIA. Esses compostos são convertidos para reagir com espécies de diazônio que podem formar adutos de DNA.¹⁸

Vale ressaltar que AHAs são substratos pobres para as enzimas NATs e não irão sofrer desintoxicação, em vez disso as NATs serão capazes de bioativar os metabólitos N-hidroxi-AHA para formar ésteres N-acetoxi-AHA que é um metabólito genotóxico que irá se ligar ao DNA.³²

Sabe-se que hoje a população está dividida em acetiladores rápidos, intermediários e lentos. Esta observação refere-se à especificidade do substrato e a genética molecular das duas isoenzimas NAT1 e NAT2. Cerca de 60% da população caucasiana apresenta reduções na proteína NAT2, o que a faz acetiladores lentos, o que por sua vez facilitaria a desintoxicação das AHAs.^{18,21} Já foram encontrados mais de 25 polimorfismos genéticos para ambos os genes NAT que podem servir como mecanismos de bioativação ou desintoxicação.¹⁸

HØIE et al. (2016) mostraram a capacidade das enzimas hSULT1A1 e hSULT1A2 em converter PhIP em um metabólito reativo, e confirmaram a presença de adutos de DNA em camundongos expressando hSULT1A1 e hSULT1A2 após a administração oral de PhIP.³³

As AHAs sofrem desintoxicação por N-glucuronidação mediada pela UGT de seu metabólito N-hidroxi-AHA.²⁷ A glucuronidação pode ocorrer tanto no átomo de N-imidazol endocíclico como o grupo amina exocíclico, e o que vai definir o local da glucoridação é a estrutura da AHA.¹⁸ No caso da A α C ela sofre desintoxicação pela CYP1A2 no anel heterocíclico seguido por O-glucuronidação, porém nos hepatócitos o metabólito é bioativado formando adutos de DNA.³⁴ A UGT1A9 é a principal isoforma

e a mais ativa na O-glucuronidação da A α C-NHOH (metabólito ativo) e a responsável pela desintoxicação do metabólito carcinogênico da PhIP.³⁴

1.4. Estratégias de inibição da formação das AHAs em alimentos cárneos

Diversos estudos relacionados à inibição na formação de AHAs em alimentos cárneos têm sido publicados, sendo a maioria pertinentes ao uso de óleos e especiarias, assim como as temperaturas de cozimento normalmente empregadas no preparo de carnes pelos consumidores em geral.³⁵

Damasius et al. (2010) estudaram a influência da adição de extratos de especiarias na formação das aminas heterocíclicas aromáticas PhIP, Trp-P-1; Trp-P-2; A α C; MeA α C e Glu-P-1.³⁶ Extratos de manjericão (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum vulgare*), manjerona (*Origanum majorana*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), erva doce (*Hierochloe odorata*), segurelha (*Satureia hortensis*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e coentro (*Coriandrum sativum*) foram adicionados antes do preparo térmico de carne bovina. Essas especiarias apresentam grande quantidade de flavonóides, que são metabólitos secundários de plantas, e possuem alta atividade antioxidante. As amostras foram preparadas em duas condições: (A) um grama carne liofilizada foi aquecida, com ou sem extratos de especiarias com 10 mL de dietilenoglicol em um cadinho sem tampa a 200 °C por 20 minutos em forno micro-ondas, e (B) um grama de carne liofilizada foi aquecida a 200 °C por 30 minutos com 9 mL de óleo de girassol em tubos fechados. Somente a PhIP foi determinada nas amostras preparadas pelo método A, e o valor médio de 0,67 ng.g⁻¹ foi determinado nas amostras controle. As amostras preparadas pelo método (A) adicionando 0,2% e 0,5% de extrato de orégano, apresentaram concentrações de 0,38 e 0,42 ng.g⁻¹ de PhIP, respectivamente, enquanto nas amostras com adição de 0,2% e 0,5% de extrato de segurelha, observou-se a formação de 0,5 e 0,42 ng.g⁻¹ de PhIP, respectivamente. Assim, os extratos de segurelha e orégano diminuíram significativamente a quantidade de PhIP formada no alimento. Para o extrato de tomilho o efeito foi menos notável em ambas concentrações. Contrariamente, amostras preparadas com 0,2% e 0,5% de extrato de manjericão apresentaram aumento na quantidade de PhIP para 1,29 e 1,88 ng.g⁻¹, respectivamente. Da mesma forma, as concentrações de PhIP encontradas após a adição de 0,2% de extrato de coentro aumentou 1,3 vezes, e com a adição de erva doce a 0,2% e 0,5 %, observou-se aumento de 1,62 e 1,39 vezes,

respectivamente. Para a adição de extrato de alecrim a 0,2% e 0,5%, foi observado o aumento de 1,21 e 1,15 vezes, respectivamente. O extrato de manjerona não apresentou efeito significativo na inibição da formação de PhIP. Apenas os extratos de orégano e manjericão foram utilizados nos ensaios realizados com o método de preparo (B). As AHAs detectadas nas amostras foram Trp-P-2, Trp-P-1 e PhIP, enquanto AαC, MeAαC e Glu-P-1 não foram detectadas. Nas amostras controle a concentração de PhIP foi de 56,4 ng.g⁻¹ e as concentrações de Trp-P-1 e Trp-P-2 foram de 37,5 ng.g⁻¹ e 8,13 ng.g⁻¹, respectivamente. Em amostras com 0,5% de extrato de manjericão e 0,5% de extrato de orégano houve um aumento em relação ao controle de 49% e 67% na concentração de PhIP, respectivamente. A quantidade de Trp-P-1 foi reduzida em 31% em amostras com extrato de manjericão, no entanto foi maior em 20% quando extrato de orégano foi adicionado. Os níveis de Trp-P-2 foram reduzidos em relação ao controle com adição de ambos os extratos, e obteve-se uma redução de 39% para o extrato de manjericão e 13% para o extrato de orégano. Os autores relatam que o efeito de promover a formação das AHA nos alimentos, mesmo que o extrato apresente propriedades antioxidantes, pode ser explicado pelo fato de existirem diferenças nas concentrações e composições dos compostos presentes nas especiarias. Um extrato pode promover a formação de uma AHA específica, porém o mesmo extrato pode diminuir a formação de outras, devido a diversidade de componentes presentes no mesmo extrato que interferem de forma diferenciada na formação das AHAs.

Smith et al. (2008) pesquisaram o efeito de marinadas, comercializadas na forma de temperos prontos para o uso, na formação MeIQx, PhIP, 1-metil-9H-pirido [4,3-b] indol (harman) e 9H-pirido [4,3-b] indol (norharman) em bifes de carne bovina grelhada.³⁷ As marinadas caribenha, sudoeste e de erva foram preparadas com água, óleo e vinagre. As amostras permaneceram na marinada por 1 hora a 4 °C antes do preparo realizado a 204 °C por 5 minutos. A marinada caribenha continha sal, açúcar, corante caramelo, tomilho, pimenta vermelha, pimenta preta, pimenta da Jamaica, alecrim e cebolinha, e os componentes da marinada sudoeste incluíam sal, açúcar, maltodextrina, dióxido de silício, páprica, pimenta vermelha, orégano, tomilho, pimenta preta, alho e cebola. A marinada de erva continha sal, açúcar, maltodextrina, amido de milho modificado, soro de leite, proteína de soja, glúten de trigo, silicato de cálcio, orégano, manjericão, alho, cebola, pimenta jalapeno, salsa e pimenta vermelha. Além disso, os autores verificaram os efeitos da base (parte do tempero que deve ser

misturada para compor a mistura) de cada marinada, porém sem as especiarias. Por exemplo a base caribenha possuía apenas sal, açúcar e corante caramelo, a base sudoeste continha sal, açúcar, maltodextrina e dióxido de silício, e a base de ervas possuía sal, açúcar, maltodextrina, amido de milho modificado, soro de leite, proteína de soja, glúten de trigo e silicato de cálcio. As concentrações de AHA encontradas para a amostra controle foram de 30,2 ng.g⁻¹ de MeIQx, 17,4 de ng.g⁻¹ PhIP, 2,26 ng.g⁻¹ de harman e 2,2 ng.g⁻¹ de norharman. Nas amostras preparadas em marinada caribenha os valores encontrados foram de 3,10 ng.g⁻¹ de MeIQx, 2,33 ng.g⁻¹ PhIP, 0,54 ng.g⁻¹ de harman e 0,52 ng.g⁻¹ (norharman). Nas amostras preparadas com a marinada sudoeste foram encontradas as concentrações de 15,8 ng.g⁻¹ de MeIQx, 5,03 ng.g⁻¹ PhIP, 0,8 ng/g harman e 1,63 ng.g⁻¹ norharman. Para a marinada de ervas foram determinadas as concentrações de 7,16 ng.g⁻¹ de MeIQx, 3,0 ng.g⁻¹ de PhIP, 1,7 ng.g⁻¹ de harman e 1,96 ng.g⁻¹ de norharman. Os resultados demonstraram que o uso da marinada caribenha apresentou a maior queda no teor de AHA (88%), seguido da marinada de erva (72%) e sudoeste (57%). Todas as marinadas continham duas ou mais especiarias da família *Lamiacea*, como por exemplo manjericão, orégano, tomilho e alecrim, que são ricas em antioxidantes polifenólicos não voláteis, e também continham quantidades significativas de sal, que são capazes de reduzir a formação de AHAs devido à alta retenção de água. As bases tiveram um efeito mais moderado na redução de AHAs, com uma diminuição média de 41% comparado com o controle. A base caribenha reduziu os níveis totais de AHAs em 54%, a sudoeste em 23% e a erva em 48%.

O efeito de marinada composta por óleo/azeite, alho, cebola e suco de limão na formação de MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, norharman e harman em hambúrgueres fritos foi avaliado por Gibis et al. (2007). Neste mesmo estudo, as amins Glu-P-1, Glu-P-2, QI, MeIQ, IQx, 7,8-DiMeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2, PhIP, AαC e MeAαC também foram investigadas mas não foram detectadas em nenhuma das amostras.³⁸ O objetivo foi encontrar a proporção dos ingredientes da marinada que promovia maior inibição na formação das AHA. Primeiramente os hambúrgueres foram testados com oito marinadas diferentes, cada uma com duas concentrações de suco de limão (2 ou 20 g em 100 g), alho (2 ou 20 g em 100 g), cebola (5 ou 50 g em 100 g) e azeite virgem em óleo de girassol (10% de azeite ou 100% de azeite). Em um segundo experimento a concentração de MeIQx foi analisada em relação aos três diferentes variáveis: as concentrações de cebola, alho e suco de limão em azeite. Os óleos básicos das

marinadas, girassol ou azeite não apresentaram efeitos significativos sobre a formação de AHA, por tanto na segunda e terceira etapa do experimento foi utilizado apenas azeite. As amostras foram preparadas a 190-200 °C por 5 minutos e a concentração de MelQx variou entre 0,3 ng.g⁻¹ a 0,43 ng.g⁻¹ e a concentração de 4,8-DiMelQx variou entre 0,15 a 0,02 ng.g⁻¹, dependendo da proporção de cada componente da marinada (cebola, alho, suco de limão). As marinadas reduziram a formação das AHAs, principalmente de MelQx com adição crescente de quantidades de alho. Quando o teor de alho foi acrescido de 2 para 20 g em 100 g de marinada, a concentração de MelQx foi reduzida em 70%. A adição de concentrações maiores de suco de limão ocasionou a menor redução de MelQx, enquanto a formação aumentou significativamente sem alho e com maiores quantidades de cebola. Este fato pode ser explicado pela presença de açúcares na cebola, que são precursores da reação de Maillard, e também contribuem para a formação das AHAs. As quantidades ótimas de cebola, alho e suco de limão, que atingiram o máximo de redução de AHA foram estimadas em 31,2%, 28,6% e 14,6% na marinada, respectivamente. Para reduzir a quantidade de MelQx sem o uso de suco de limão, as quantidades ótimas de cebola e alho foram calculadas em 38,5% e 4,1% na marinada, respectivamente. As maiores inibições na formação de MelQx foram significativas apenas quando o alho foi adicionado nas marinadas. As concentrações de norharman (0,9 - 13 ng.g⁻¹) e harman (2,9 - 21,5 ng.g⁻¹) aumentaram com maiores concentrações de alho, cebola e suco de limão nas marinadas. As concentrações de PhIP e 4,8-DiMelQx eram próximas do limite de detecção (0,02 ng.g⁻¹), portanto nenhum efeito significativo foi observado.

A investigação de diferentes condições de preparo de bacon frito em relação à formação de aminas aromáticas heterocíclicas, como MelQx e PhIP, norharman e harman também foi realizada por Gibis et al. (2015).³⁹ As fatias de bacon foram fritas por 3, 4, 5, e 6 minutos a 150–170 °C, assim como por 2 e 3 minutos a 200–220 °C. Os resultados mostraram que tempos de cozimentos mais longos resultam em aumento da quantidade de MelQx, PhIP, norharman e harman. No tempo máximo de cozimento, 6 minutos a 150-170°C, as concentrações de MelQx, PhIP, norharman e harman foram respectivamente de 4,9 ng.g⁻¹, 1,1 ng.g⁻¹, 14,1 ng.g⁻¹ e 1,7 ng.g⁻¹, enquanto que na mesma temperatura por 3 minutos, as concentrações de MelQx, PhIP, norharman e harman foram 1,9 ng.g⁻¹, 0,2 ng.g⁻¹, 5,0 ng.g⁻¹ e 0,4 ng.g⁻¹ respectivamente. A temperatura de preparo também demonstrou influência na formação das AHAs. Para o preparo a 200-220 °C por 3 minutos, as concentrações

MelQx, PhIP, norharman e harman encontradas foram de 5,6 ng.g⁻¹, 2,6 ng.g⁻¹, 19,9 ng.g⁻¹ e 16 ng.g⁻¹, respectivamente. Os resultados encontrados devem-se principalmente ao fato de que em períodos de cozimento mais longos ou em temperaturas mais altas, há um aumento na perda de peso do alimento e redução da atividade de água, processos esses que contribuem para a formação de AHA.

Lee et al. (2010) observaram a influência do azeite extra virgem na formação de Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, norharman, harman, AαC, MeAαC, IQ, MelQ, MelQx, PhIP, Tri-MelQx, 4,8- DiMelQx e 7,8- DiMelQx em carne bovina preparada em assadeira elétrica.⁴⁰ A adição de 2, 4, 6, 8 ou 10 g de azeite em 100 g de bifes de carne bovina assados a 200 °C por 5 minutos de cada lado, contribuíram para a redução dos níveis de AHAs, principalmente de Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-2, norharman, AαC, MeAαC, MelQ, MelQx e PhIP. A observação pode ser explicada pela elevada quantidade de polifenóis presentes no azeite, que possuem propriedades antioxidantes, sendo assim quanto maior a quantidade de azeite extra virgem adicionada na carne bovina maior a redução de AHAs, com algumas exceções. A adição de 2 g de azeite inibiu consideravelmente a formação das AHAs, com uma taxa média de redução de 78,25%. Além disso a concentração de MelQ foi reduzida a abaixo do limite de detecção. No entanto, a adição de quantidade excessiva de azeite extra virgem (acima de 8 g) promoveu a formação principalmente de MelQx e Glu-P-1. Os lipídios aumentam a formação de certos produtos da reação de Maillard, como pirazinas e aldeídos, moléculas que contribuem para a formação da parte quinoxalina das imidazo-quinoxalinas. Dentre as AHAs estudadas, a Trp-P-1, Trp-P-2, Norharman, Harman, AαC, MelQx, MeAαC e PhIP foram detectadas em todas as amostras analisadas, sendo as que apresentaram maiores valores na amostra controle (0 g de azeite) foram PhIP (225,84 ng/g) e Trp-1-1 (128,92 ng.g⁻¹). A adição de 8 g de azeite na carne reduziu os níveis de PhIP e Trp-P-1 para 34,06 ng.g⁻¹ e 6,86 ng.g⁻¹, respectivamente.

Os efeitos dos condimentos tomate, pimenta, alho, páprica e óleo comestível na formação de AHAs em filés de frango grelhados a 215-225 °C por 8 minutos foram avaliados por Khan et al. (2015).⁴¹ DMIP, MelQx, harman, norharman, PhIP e 4,8-DiMelQx foram as aminas mais comumente identificadas em todas as amostras e os níveis individuais das AHAs encontrados nas amostras controle variaram entre 0,93 e 27,52 ng.g⁻¹. As aminas IQ, MelQ, AαC, MeAαC, Trp-P-1 e Trp-P-2 estavam abaixo do limite de detecção (0,03 ng.g⁻¹). Os resultados confirmaram que a formação

de AHAs diminuiu após a adição dos condimentos, principalmente de DMIP, MeIQx, PhIP e 4,8-DiMeIQx. Enquanto no controle as quantidades de DMIP, MeIQx, PhIP e 4,8-DiMeIQx variaram entre 1,65 a 27,52 ng.g⁻¹, nas amostras contendo tomate, pimenta, alho, páprica ou óleo comestível, as concentrações observadas foram de 0,31 a 2,46 ng.g⁻¹, 0,14 a 6,73 ng.g⁻¹, 1,09 a 12,34 ng.g⁻¹, 0,20 a 9,42 ng.g⁻¹ e 1,24 a 19,57 ng.g⁻¹, respectivamente. O uso do tomate no preparo promoveu maior taxa de inibição em comparação às outras amostras com diferentes condimentos, pois o tomate possui grande quantidade de carotenoides e flavonóides, como a quercetina, que possuem elevada propriedade antioxidante e são capazes de reduzir a formação de AHAs. As amostras preparadas com óleo comestível não apresentaram propriedades de inibição na formação de AHAs, e os resultados obtidos são semelhantes aos obtidos para as amostras controle. Contrariamente ao exposto anteriormente, as concentrações de harman e norharman aumentaram em comparação ao controle. Nas amostras preparadas com óleo comestível as concentrações encontradas foram 10,58 e 17,7 ng.g⁻¹, de harman e norharman, respectivamente, enquanto nas amostras controle os valores observados foram de 0,93 e 2,84 ng.g⁻¹ de harman e norharman, respectivamente.

A influência do tempo de armazenamento a frio da carne bovina crua (lombo, rosbife e costela) foi avaliada em relação à quantidade de AHAs formadas após o tratamento térmico.⁴² As amostras foram mantidas em embalagem a vácuo por 5 ou 15 dias a 2 °C e após o prazo de estocagem foram grelhadas a 180 ou 280°C. As AHAs investigadas neste estudo foram IQx, IQ, MeIQx, MeIQ, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, Norharman, 4,7,8-triMeIQx, Harman, Phe-P-1, Trp-P 1, Trp-P 2, PhIP, MeAcC e AcC. Os valores encontrados de AHA total para o rosbife, lombo e costela armazenados por 5 dias e preparados na temperatura de 180 °C foram de 151 ng.g⁻¹, 143 ng.g⁻¹ e 11 ng.g⁻¹, respectivamente. Porém, quando as mesmas amostras foram grelhadas a 280 °C os valores de AHA total encontrados foram de 317 ng.g⁻¹, 268 ng.g⁻¹ e 211 ng.g⁻¹, respectivamente. Sendo assim, estes experimentos também demonstraram que o aumento da temperatura de preparo contribuiu para aumentar significativamente a quantidade de AHA no alimento. Para o segundo grupo de amostras armazenadas por 15 dias e grelhadas a 180 °C, os valores de AHAs encontrados para o rosbife, lombo e costela foram respectivamente de 358 ng.g⁻¹, 210 ng.g⁻¹ e 179 ng.g⁻¹ e quando esses mesmos alimentos foram preparados a 280 °C, os valores de AHA totais foram 472 ng.g⁻¹, 453 ng.g⁻¹ e 358 ng.g⁻¹,

respectivamente. Portanto, o período do armazenamento a frio contribuiu para aumentar a quantidade de AHA no alimento. Houve elevação na formação de AHAs quando a carne crua foi armazenada a frio, pois o conteúdo de aminoácidos livres aumentou em função do tempo de armazenamento devido a proteólise, e os aminoácidos livres são substratos para a reação de Maillard. Além disso, foi observado que carnes com maior teor de gordura contribuem para a diminuição da formação de AHAs em relação às carnes magras, isso porque as carnes mais gordurosas apresentam menores quantidades de precursores de AHA, e também melhor condutividade térmica, conseqüentemente são cozidas, grelhadas ou fritas mais rapidamente, diminuindo o tempo de exposição a altas temperaturas e reduzindo os níveis de AHA. As aminas de maior incidência foram 4,8-DiMeIQx e 7,8-DiMeIQx enquanto as aminas IQ, MeIQx, MeIQ, Phe-P 1 and AaC estavam presentes em níveis próximos aos limites de detecção. IQx, 4,7,8-triMeIQx, Trp-P 1, Trp-P 2 e MeAaC não foram detectadas nas amostras avaliadas.

Puangsombat et al. (2010) investigaram a influência da temperatura e a inibição da formação de IQ, IQx, MeIQ, MeIQx e PhIP em hambúrgueres com o uso de extratos etanólicos de alecrim preparados em 100% água, 10% etanol, 20% etanol, 30% etanol e 40% etanol.⁴³ Os extratos foram adicionados diretamente em hambúrgueres de 100 g em três níveis de concentração final de 0,05%, 0,2% e 0,5% m/m. As amostras foram mantidas a 4 °C por 12 horas e em seguida grelhadas a 191 °C por 6 minutos de cada lado ou a 204 °C por 5 minutos de cada lado. Todos os hambúrgueres, incluindo aqueles sem extratos de alecrim (controle), continham MeIQx e PhIP, enquanto IQ, IQx e MeIQ não foram detectados nas amostras, ou seja, estavam em concentração abaixo do limite de detecção de 0,15 ng.g⁻¹. As concentrações de 4,96 ng.g⁻¹ MeIQx e 3,14 ng.g⁻¹ PhIP foram encontradas nas amostras controle preparadas a 191 °C, enquanto que o preparo a 204 °C gerou a formação de 6,93 ng.g⁻¹ MeIQx e 4,89 ng.g⁻¹ PhIP. Desta forma, neste trabalho também foi observado que o aumento da temperatura no preparo do alimento aumenta a formação de AHAs. Temperaturas mais altas durante o cozimento aumentam a taxa de transferência de massa de água contendo precursores para reação de Maillard, a partir do centro até a superfície dos hambúrgueres, causando maior formação de AHAs nos alimentos. Todos os extratos de alecrim diminuíram significativamente a quantidade de AHA e não foi observada diferença estatística na inibição de AHAs nos extratos de alecrim a 0,05%, 0,2% ou 0,5%. Para os hambúrgueres preparados a 191 °C, o extrato com 30% de etanol

promoveu a maior inibição na formação de AHAs, redução de 86,2% em relação ao controle, com valores reduzidos a 0,46 e 0,81 ng.g⁻¹ de MeIQx e PhIP, respectivamente. Entretanto, para hambúrgueres preparados na temperatura de 204 °C o extrato de 20% de etanol foi o que promoveu a maior inibição na formação de AHAs, resultando em concentrações de 0,61 ng.g⁻¹ MeIQx e 1,33 ng.g⁻¹ PhIP. O efeito representou redução em 91,7% e 85,3% na formação de MeIQx e PhIP, respectivamente, quando comparado ao controle.

Zeng et al. (2016) estudaram sobre o efeito da pimenta malagueta e da capsaicina na formação de PhIP, DMIP, 1,5,6-TMIP, IQx, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, Harman e Norharman em hambúrgueres de carne bovina assados por 10 minutos cada lado a 225 °C.⁴⁴ Capsaicina é o componente ativo encontrado nas pimentas, sendo capaz de eliminar radicais livres. A pimenta e a capsaicina reduziram a formação de AHA, principalmente de PhIP de forma dose dependente, os níveis de pimenta malagueta que foram testados nas amostras foram de 0,5%, 1% e 1,5%, enquanto que as quantidades de capsaicina testadas no alimento foram de 2 mg, 4 mg e 6 mg para equiparar a quantidade de capsaicina encontrada na pimenta malagueta. A PhIP apresentou as maiores concentrações no grupo controle, 8 ng.g⁻¹, enquanto a concentração de 10,08 ng.g⁻¹ foi observada para AHAs total. As concentrações de AHA totais obtidas após adição de 0,5%, 1% e 1,5% de pimenta malagueta foram de 5,46 ng.g⁻¹, 6,53 ng.g⁻¹ e 7,62 ng.g⁻¹ respectivamente, enquanto as quantidades de PhIP foram de 2,6 ng.g⁻¹, 3,15 ng.g⁻¹ e 3,74 ng.g⁻¹, respectivamente. Portanto houve uma redução de 46%, 35% e 24% na quantidade de AHA totais e uma redução de 68, 61 e 53% para PhIP quando comparados ao controle. A adição de 2, 4 ou 6 mg de capsaicina nas amostras, reduziu a concentração de AHA totais para 2,03 ng.g⁻¹, 3,26 ng.g⁻¹ e 5,99 ng.g⁻¹ respectivamente, enquanto os níveis de PhIP encontrados foram de 0,14 ng.g⁻¹, 0,59 ng.g⁻¹ e 2,66 ng.g⁻¹, respectivamente. Sendo assim houve uma inibição de 80%, 68% e 41% AHA totais e de 98%, 93% e 67% para PhIP, comparando-se ao controle. Para as aminas IQx, MeIQx e 4,8 Di-MeIQx, harman e norharman, observou-se que a maioria delas podem ter a sua formação promovida por diferentes quantidades de pimenta, mas suprimida pela capsaicina (exceto MeIQx, harman e norharman). Contudo, a capsaicina é capaz de promover uma maior inibição do que a pimenta malagueta, isso porque a pimenta possui vários outros componentes além da capsaicina, que poderiam promover a formação das AHAs, como IQx, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, harman e norharman.

Os efeitos inibitórios da pimenta-do-reino na formação de IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx e PhIP em almôndegas com 30% de gordura foram avaliados.⁴⁵ A pimenta-do-reino foi polvilhada 12 horas antes do preparo sobre a superfície das almôndegas (45 g) a 1% m/m, e as amostras foram fritas a 175°C, 200°C e 225°C por 7,5 minutos de cada lado. O teor de AHA aumentou com o aumento da temperatura de preparo, como demonstrado em outros estudos. A MeIQx não foi encontrada nas amostras analisadas neste estudo, tanto no controle quanto com adição de pimenta do reino. Nas amostras controle quando preparadas a 175 °C, somente a IQ na concentração de 1,40 ng.g⁻¹ foi observada, enquanto as demais estavam abaixo do LOQ de 0,01 ng.g⁻¹. Quando fritas a 200 °C observou-se a formação de 5,46 e 0,24 ng.g⁻¹ de IQ e MeIQ, respectivamente. Contudo, a 225 °C não foi observada a formação de IQ, mas houve a formação de 2,66 ng.g⁻¹ MeIQ, 3,65 ng.g⁻¹ 4,8-DiMeIQx e 31,80 ng.g⁻¹ PhIP. Com o uso da pimenta do reino, a formação de AHAs total foi inibida em 33% quando preparadas a 175 °C e 12% na temperatura de 200 °C. A concentração de IQ nas amostras preparadas a 175 °C foi reduzida a 0,93 ng.g⁻¹, entretanto no preparo a 200 °C o valor aumentou para 4,85 ng.g⁻¹ e decresceu para 0,18 ng.g⁻¹ quando preparada a 225 °C. Na temperatura de 225 °C todas as AHAs estavam abaixo do LOQ de 0,01 ng.g⁻¹, portanto com inibição de 100% em relação ao controle. De forma semelhante aos outros estudos citados, a pimenta apresenta a propriedade de reduzir a formação de AHA, provavelmente devido a presença de substâncias antioxidantes.

Oz et al. (2015) averiguaram os efeitos do uso de ácido linoleico conjugado (CLA) na formação de IQ, IQx, MeIQx, MeIQ, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, AαC e MeAαC em almôndegas grelhadas.⁴⁶ A carne bovina (15% de gordura) foi temperada com sal, pimenta vermelha, pimenta preta, cominho e cebola. Em seguida, as almôndegas do grupo controle (0% CLA) e aquelas com concentrações de 0,05, 0,1, 0,25 e 0,50 % m/m de CLA foram preparadas. As amostras foram grelhadas a 150 °C, 200 °C e 250 °C por 9 minutos. As aminas IQ e IQx, com LOQ de 0,029 e 0,013 ng.g⁻¹, respectivamente, não foram detectadas nas amostras, e as de maior incidência foram 7,8-DiMeIQx e PhIP. Nas amostras controle preparadas a 150 °C, somente 0,02 ng.g⁻¹ 7,8-DiMeIQx e 0,14 ng.g⁻¹ PhIP foram determinadas. O preparo a 200 °C ocasionou a formação de 0,04 ng.g⁻¹ 7,8-DiMeIQx, 0,10 ng.g⁻¹ PhIP e 0,05 ng.g⁻¹ de AαC, enquanto que a 250 °C observou-se a formação de 0,18 ng.g⁻¹ MeIQx, 0,07 ng.g⁻¹ MeIQ, 0,13 ng.g⁻¹ 7,8-DiMeIQx, 0,04 ng.g⁻¹ 4,8-

DiMeIQx, 0,80 ng.g⁻¹ PhIP e 0,24 ng.g⁻¹ de AαC. Nota-se novamente neste trabalho o aumento da temperatura de preparo como fator determinante na formação e concentração de AHAs. A adição de CLA ocasionou inibição na formação de AHAs, notadamente para as amostras grelhadas a maior temperatura. A concentração total de AHAs para o controle preparado a 250 °C foi de 1,47 ng.g⁻¹, enquanto para as amostras com 0,05%, 0,1%, 0,25% e 0,5% de CLA foram determinadas as concentrações de 1,49 ng.g⁻¹, 1,16 ng.g⁻¹, 0,69 ng.g⁻¹ e 0,65 ng.g⁻¹ respectivamente. Portanto, pode-se considerar que a partir da adição de 0,1% de CLA houve inibição efetiva na formação de AHAs. O mecanismo exato do efeito do CLA na redução da formação de AHA permanece pouco compreendido, mas acredita-se ser devido às propriedades antioxidantes do CLA.

A PhIP é uma das AHAs de maior incidência em alimentos e o efeito do melaço de cana de açúcar na formação de PhIP em um sistema modelo foi avaliado por Yu et al. (2015).⁴⁷ A reação entre creatinina (0,6 mmol), fenilacetaldéido (0,6 mmol) e extrato de melaço de cana (controle, 0,005g, 0,01g, 0,02g, 0,04g ou 0,08g), dissolvidos em 10 mL água, foi realizada a 200°C por 3 horas, favorecendo a formação de PhIP. Os níveis de fenilacetaldéido diminuíram com o aumento da quantidade de extrato de melaço de cana de açúcar. Os autores relacionam este efeito ao aprisionamento do fenilacetaldéido pelos polifenóis presentes no melaço, impedindo assim a formação de PhIP. Os polifenóis presentes no extrato do melaço da cana e a carbonila do fenilacetaldéido podem formar novos produtos, e estes produtos interferem na reação com a creatinina. A quantidade de PhIP encontrada no controle foi de 619,1 µg.L⁻¹, e as concentrações de PhIP encontradas em amostras contendo 0,005g, 0,01g, 0,02g, 0,04g e 0,08g de extrato de melaço de cana de açúcar foram, respectivamente, 469,6 µg.L⁻¹, 437,0 µg.L⁻¹, 401 µg.L⁻¹, 309,5 µg.L⁻¹ e 249,0 µg.L⁻¹. Portanto, 0,08 g de extrato de melaço de cana de açúcar inibiu cerca de 60% a formação de PhIP em relação ao controle. A redução dos produtos de condensação aldólica também foi observada em todas as amostras que continham adição de extrato de melaço de cana de açúcar. Os autores concluíram que o extrato do melaço da cana de açúcar pode ser utilizado no preparo de carnes e sugerem a possibilidade de aplicação na prática culinária diária.

1.5. Relação Aminas Heterocíclicas Aromáticas e Câncer

O câncer é hoje um dos problemas de saúde pública mais complexos que o sistema de saúde brasileiro enfrenta, dada a sua magnitude epidemiológica, social e econômica.⁴⁸

Segundo a Organização Mundial da Saúde o câncer é a segunda causa de morte global e foi responsável por 8,8 milhões de mortes em todo mundo em 2015 e estima-se que o número de novos casos pode aumentar 70% nas próximas duas décadas.⁴⁹

O câncer é uma doença em que surgem alterações de células normais em células anormais com uma proliferação descontrolada e que, portanto, não responde aos mecanismos de controle comum do ciclo celular.⁵⁰

As células tumorais adquirem características próprias tais como:

- I) Autossuficiência em sinais proliferativos: para que as células normais saiam do estado de quiescente e comece a se proliferar é necessário que recebam sinais extrínsecos. Isto pode ocorrer de diversas formas. As células tumorais podem produzir os seus próprios fatores de crescimento, levando a uma estimulação proliferativa autócrina. Além disso pode haver alterações estruturais das moléculas receptoras que facilitam sua ativação independente.
- II) Insensibilidade aos sinais antiproliferativos: as células começam a desenvolver a capacidade de evadir ou resistir a sinais que regulam negativamente a proliferação celular. Muitos destes sinais dependem da ação de genes supressores de tumor. Esses genes estão normalmente envolvidos em processos de parada de crescimento celular.
- III) Evasão aos mecanismos de morte celular: as células tumorais desenvolvem uma variedade de estratégias para evadir o mecanismo apoptóticos. Sendo o mais comum a perda da função do gene supressor de tumor TP53.
- IV) Potencial replicativo ilimitado: ao contrário das células normais que possuem um número limitado de ciclos de divisão, as células tumorais possuem capacidade ilimitada de divisão.
- V) Evasão do sistema imune: as células tumorais escapam da detecção do sistema imune diminuindo a expressão de determinadas proteínas apresentadoras de antígenos.⁵¹

A transformação de uma célula normal em cancerosa requer a ocorrência de

múltiplas alterações em seu material genético. Em consequência desse acúmulo de mutações, altera-se a regulação do celular normal e as células passam a se dividir de forma autônoma, e acumular células alteradas que formaram o tumor. Conseqüentemente alterações nas propriedades de aderência dessas células fazem com que adquiram a habilidade de invasão de tecidos adjacentes, bem como a formação de metástase.⁵⁰

Esse processo de transformação da célula normal e cancerosa chama-se Oncogênese e, em geral, acontece lentamente podendo levar vários anos. Os efeitos cumulativos de diferentes agentes cancerígenos são responsáveis pelo início, promoção, progressão e inibição do tumor. A carcinogênese é determinada pela exposição a esses agentes, em uma dada frequência e período de tempo, e pela interação entre eles. Esse processo é composto por três estágios:

I) Estágio de iniciação, no qual os genes sofrem ação dos agentes cancerígenos.

II) Estágio de promoção, no qual os agentes oncopromotores atuam na célula já alterada.

III) Estágio de progressão, caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células.⁴⁸

A relação entre a exposição às AHAs e a carcinogenicidade foi descoberta há mais de 35 anos, pelo professor Takashi Sugimura que mostrou que as partes carbonizadas e a fumaça gerada a partir de peixe e carne grelhados continham substâncias que exibiam potente atividade em ensaios de mutageneidade à base de *Salmonella typhimurum*.⁵²

Estudos de carcinogenicidade realizados em camundongos e ratos demonstraram que algumas AHAs podem produzir tumores de cólon, glândulas mamárias e próstata.

Segundo Sigimura et al. as AHAs sozinhas não têm capacidade de produzir câncer, mas quando há a administração simultânea de diferentes tipos de agentes cancerígenos isso pode resultar a efeitos aditivos ou sinérgicos.⁵³

Embora a correlação entre AHAs e câncer não seja consistente, existem evidências epidemiologias associando a ingestão de AHAs ao câncer de colón. Outro ponto que pode estar relacionado aos aparecimentos de alguns tipos de câncer, é que algumas pessoas podem ser mais suscetíveis as AHAs que outros. Como o metabolismo dessas amins está relacionando ao citocromo P4501A2 e as NAT2, indivíduos que são considerados acetiladores rápidos serão mais suscetíveis a

desenvolverem câncer colorretal porque essas pessoas ativam mais rapidamente as AHAs.⁵⁴

1.6. Estudos internacionais relativos à presença de Aminas Heterocíclicas Aromáticas em alimentos e avaliação da exposição humana

Soncu et al. (2017), estudaram a presença de IQ, IQx, MeIQ, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, AαC, and MeAαC em produtos de frango empanados (coxa, asa, *nuggets* e hambúrguer), coletados em restaurantes locais da cidade de Ancara, Turquia.⁵⁵ Para os cálculos de avaliação de exposição, 365 indivíduos responderam pessoalmente ou *online*, um questionário de frequência de consumo de alimentos. Os participantes relataram quais dos produtos selecionados eram consumidos, o local de consumo e a frequência: uma vez por ano, duas vezes por ano, uma vez por mês, duas vezes por mês, uma vez por semana, duas vezes por semana ou todos os dias. As aminas IQ (LOD 0,004 ng.g⁻¹) e MeAαC (LOD 0,010 ng.g⁻¹) não foram detectadas nas amostras. Entre as aminas analisadas, a MeIQx foi a que apresentou maior incidência e as maiores concentrações, que variaram entre 0,22 a 33,73 ng.g⁻¹ para coxas, 11,22 a 62,83 ng.g⁻¹ em asas, < LOQ a 9,72 ng.g⁻¹ para hambúrgueres e 1,94 a 22,01 ng.g⁻¹ nos *nuggets*. As estimativas médias de ingestão de MeIQx por faixa etária foram: 15-25 anos, 673,59 ng.dia⁻¹ e 10,70 ng.kg p.c.⁻¹.dia⁻¹; 26-35 anos, 360,24 ng.dia⁻¹ e 5,14 ng.kg p.c.⁻¹.dia⁻¹; 36-50 anos, 444,26 ng.dia⁻¹ e 5,80 ng. kg p.c.⁻¹. dia⁻¹; e acima de 50 anos, 298,50 ng.dia⁻¹ e 3,52 ng.kg p.c.⁻¹.dia⁻¹. Os alimentos que mais contribuíram para a ingestão de MeIQx foram as coxas empanadas (83,89 a 196,33 ng.dia⁻¹) e asas de frango (183,26 a 352,66 ng.dia⁻¹), demonstrando a representatividade do consumo destes alimentos para a ingestão total de AHAs pela população. A “Lei de Água Potável Segura e Imposição Tóxica de 1986”, comumente conhecida como Proposição 65 da Califórnia, contém uma lista de compostos que são conhecidos pelo governo americano por causar câncer ou toxicidade reprodutiva. Ainda nesta lista são apresentados valores de NSRL (do inglês, *No Significant Risk Level*), ou seja, os níveis de máximos de ingestão diária para não apresentar risco significativo. Os valores de NSRL reportados para IQ, MeIQ e MeIQx são 500, 460 e 410 ng.dia⁻¹, respectivamente. Portanto,

observa-se dos resultados reportados que o valor de 410 ng.dia^{-1} é excedido para as faixas etárias de 15-25 anos e 36-50 anos.

A estimativa de ingestão da PhIP a partir da dieta habitual argentina, rica em carnes vermelhas, foi realizada comparando diferentes procedimentos de preparo e tipo de carne, além de utilizar dados de uma pesquisa de padrões de consumo com a participação de 1711 indivíduos realizada na cidade de Córdoba.⁵⁶ Duzentas e quarenta amostras (bovina, frango, suína e peixe) foram preparadas de acordo com métodos tradicionais: grelhado na brasa, grelhado na chapa, salteado em frigideira e assado no forno. Para cada um dos quatro tipos de carnes selecionados, foram escolhidos cortes magros (pouca gordura) e gordos (maior teor de gordura), que foram preparados até o cozimento completo mantendo a temperatura em $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ no interior da carne, e também bem passados com formação de crosta para serem utilizadas como controle positivo. A PhIP somente foi quantificada na carne bovina magra bem passada na concentração de 341 ng.g^{-1} . Nas demais amostras os valores estavam abaixo do LOD ($0,17 \text{ ng.g}^{-1}$). O consumo de carne vermelha diário pela população foi estimado em 320 g.dia^{-1} , dos quais 150 g correspondem à carne com crosta. O consumo médio de carne magra bem passada foi estimado ao redor de 35 g.dia^{-1} , desta forma a estimativa de ingestão de PhIP foi calculada em $12.268,0 \text{ ng.dia}^{-1}$, considerando o consumo de carne bem passada. Para fins de comparação, dividimos a estimativa de ingestão diária por 70 kg de peso corpóreo e obtemos o valor de $175,2 \text{ ng.kg pc.}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, o que supera por exemplo os valores encontrados na Turquia, como apresentado no parágrafo anterior.

Keating et al. (2004), estimaram a ingestão de PhIP, MeIQx, 4,8 DiMeIQx, A α C e IQ pela população americana empregando um banco de dados, construído a partir de valores publicados na literatura com concentrações das AHAs em alimentos, e de dados de consumo dos alimentos obtidos na “Pesquisa Continuada de Ingestão Alimentar por Indivíduos”, realizada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, nos períodos de 1989–1991 e 1994–1996. Esta pesquisa utilizou inquéritos alimentares e categorizou a quantidade de carne consumida pelos indivíduos diariamente e o tipo de preparo.⁵⁷ Os dados obtidos na entrevista de 20.185 participantes foram usados neste estudo, que também avaliou preferências de consumo e preparo dos alimentos entre as etnias afro-americana e branca. Os resultados mostraram que aproximadamente 70% da ingestão média de AHAs pela população corresponde a PhIP, sendo o frango frito o alimento que mais contribui para

esta ingestão. Considerando os dados apresentados para população adulta acima dos 30 anos, divididos por etnia branca e afro-americana, o consumo de PhIP para mulheres e homens brancos foi de 9,2 ng. kg pc.⁻¹.dia⁻¹ enquanto para os homens e mulheres afro-americanos as estimativas foram de 12,6 e 12,7 ng. kg pc.⁻¹.dia⁻¹, respectivamente. A ingestão de MeIQ e DiMeIQx para a etnia branca foi igual para homens e mulheres com valores estimados entre 0,38 e 1,4 ng. kg pc.⁻¹.dia⁻¹, respectivamente. Para os homens afro-americanos a ingestão de MeIQ e DiMeIQx foi estimada entre 0,47 a 2,1 ng. kg pc.⁻¹.dia⁻¹, e para as mulheres entre 0,41 e 1,6 ng. kg pc.⁻¹.dia⁻¹, respectivamente. Os valores de ingestão total das AHAs foram em 13,6 e 13,4 ng. kg pc.⁻¹. dia⁻¹ para mulheres e homens brancos, respectivamente. Entre os afro-americanos, o valor reportado foi de 18,4 ng. kg pc.⁻¹.dia⁻¹ para os dois gêneros. Avaliação anteriores realizadas na década de 90, estimaram valores de ingestão total de AHAs (MeIQx, Di-MeIQx e PhIP) entre 6,3 e 20,1 ng. kg pc.⁻¹. dia⁻¹ para a população americana.^{58,59}

As concentrações de IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx e PhIP em produtos prontos para consumo preparados com carne de frango, suína ou peixe, popularmente encontrados no mercado britânico, foram determinadas para avaliar a exposição da população às aminas selecionadas.⁶⁰ Entre os alimentos foram selecionados: peito de frango grelhado, peito de frango com molho Tikka (a base de iogurte), peito de frango grelhado na brasa, presunto, bacon assado, bacon crocante defumado, linguiça suína defumada, almôndega sueca, salmão assado com mel e salmão com molho de pimenta agri-doce. A concentração total de AHAs nos alimentos variou entre 0,57 ng.g⁻¹ e 37,45 ng.g⁻¹. Somente o frango grelhado e o salmão assado com mel continham todas as cinco aminas investigadas. O frango grelhado na brasa continha a maior concentração total de AHAs (37,45 ± 4,89 ng.g⁻¹) seguido pelo frango grelhado (18,81 ± 9,02 ng.g⁻¹), frango Tikka, preparado com molho de iogurte (18,07 ± 2,56 ng.g⁻¹) e salmão grelhado com mel (17,12 ± 5,86 ng.g⁻¹). A IQ apresentou as maiores médias de concentrações que variaram entre 2,1 a 22,68 ng.g⁻¹, sendo a média mais alta (22,68 ng.g⁻¹) observada no frango grelhado na brasa, seguida do frango Tikka (9,74 ng.g⁻¹). A 4,8-DiMeIQx foi encontrada em todas as amostras, com exceção do presunto, em concentrações que variaram entre 0,30 e 12,61 ng/g, com a maior concentração presente no bacon assado. PhIP foi detectada nas fatias de frango grelhada (2,27 ng.g⁻¹), no frango Tikka (5,39 ng.g⁻¹) e no salmão assado com mel (5,71 ng.g⁻¹). A MeIQ não estava presente nas amostras de frango Tikka,

presunto defumado e salmão com pimenta agridoce. Nas amostras positivas, as concentrações de MeIQ variaram entre $<0,01$ a $3,39 \text{ ng.g}^{-1}$, na qual a maior concentração foi encontrada no bacon crocante. MeIQx apresentou níveis entre $< 0,02$ a $2,93 \text{ ng.g}^{-1}$, e neste caso o frango grelhado foi a amostra com maior concentração. Os cálculos de estimativa de ingestão foram realizados utilizando os dados da Pesquisa Nacional sobre Dieta e Nutrição (2015) obtidos para homens e mulheres divididos em duas faixas etárias: adultos, entre 19-64 anos e idosos, acima de 65 anos. Como consequência da maior incidência e das maiores concentrações de IQ nas amostras de alimentos analisadas, a contribuição desta amina para a exposição diária às AHAs foi maior em relação às demais, com valores entre 0 e $189,38 \text{ ng.dia}^{-1}$. Observou-se que frango grelhado na brasa apresenta a maior contribuição para a ingestão de AHAs. Os valores estimados de ingestão das demais aminas avaliadas foram entre 0 e $22,71 \text{ ng.dia}^{-1}$ para a MeIQ, entre 0 e $24,47 \text{ ng.dia}^{-1}$ para a MeIQx, e a com a menor contribuição para a ingestão total de AHAs reportada neste estudo, a PhiP de 0 a $8,62 \text{ ng.dia}^{-1}$ de PhIP. A estimativa de ingestão total das aminas avaliadas foi em 234 g.dia^{-1} ($3,3 \text{ ng.kg pc}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e 119 g.dia^{-1} ($1,7 \text{ ng.kg pc}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), para homens entre 19 - 64 anos e > 65 , respectivamente. Para as mulheres, foi relatado estimativas de ingestão maiores em relação aos homens, sendo de 289 g.dia^{-1} ($4,1 \text{ ng.kg pc}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e 209 g.dia^{-1} ($2,9 \text{ ng.kg pc}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), para as faixas etárias entre 19-64 anos e >65 , respectivamente. Os valores de ingestão em $\text{ng.kg pc}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ foram calculados considerando peso médio dos indivíduos de 70 kg.

Jahurul et al. (2010) estudaram a exposição dietética da população da Malásia à IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP, 4,8-DiMeIQx e 7,8-DiMeIQx presentes em produtos cárneos.⁶¹ Quarenta e duas amostras a base de carne bovina, frango e peixe, prontas para o consumo e preparadas a altas temperaturas como fritar, assar, grelhar, foram adquiridas no comércio local. Um questionário de frequência alimentar foi aplicado a 600 indivíduos acima de 18 anos para os cálculos de estimativa de ingestão. Nos alimentos quantificados, as AHAs de maior incidência foram PhIP, MeIQx e MeIQ, com 24%, 23% e 12% de amostras positivas, respectivamente. IQ não foi detectada em nenhuma amostra (LOD, $1,5 \text{ ng.g}^{-1}$). As concentrações de MeIQ variaram entre $< 0,5$ a $3,8 \text{ ng.g}^{-1}$ enquanto a MeIQx estava presente em níveis entre $< 0,3$ a $24,3 \text{ ng.g}^{-1}$, esta última principalmente com maiores concentrações nas amostras de frango grelhado e frito. A maior concentração de PhIP foram determinadas nas amostras de frango grelhado com molho de amendoim ($30,0 \text{ ng.g}^{-1}$) e hambúrguer bovino ($15,1$

ng.g⁻¹). Concentrações menores em comparação às citadas anteriormente foram observadas nas amostras para a 4,8-DiMeIQx (< 0,5 – 0,7 ng.g⁻¹) e 7,8-DiMeIQx (< 0,9 – 1,6 ng.g⁻¹). As concentrações totais de AHAs estudadas variaram entre <LOD para todas as aminas e 38,7 ng.g⁻¹. Nenhuma das amostras foi positiva para todas as aminas e vinte e cinco amostras não apresentaram níveis detectáveis para nenhuma das aminas avaliadas. A estimativa de ingestão média de AHAs foi de 553,7 ng.dia⁻¹, e em concordância com os resultados apresentados para as concentrações das aminas nas amostras, a maior contribuição para esta ingestão está relacionada à ingestão de PhIP, MeIQx e MeIQ. Além disso, os resultados revelaram que o frango frito e grelhado são as principais fontes alimentares de aminas heterocíclicas na dieta da população da Malásia.

A identificação e quantificação de quinze AHAs (DMIP, IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx Norharman, Harman, PhIP, Trp-P-1, AαC and MeAαC, Glu-P-2, Glu-P-1 e Trp-P-2) em alimentos cárneos comumente consumidos na Espanha, preparados fritos ou grelhados, foi realizada por Busquets et al. (2004).⁶² Amostras de hambúrguer bovino frito, lombo de porco frito, filé de peito de frango frito, salsicha de porco frita, filé de peito de frango grelhado, bife de cordeiro grelhado e bife bovino de carne, foram preparadas de acordo com hábitos domésticos utilizados pela população espanhola. Para estimar o consumo destes produtos, os autores utilizaram um questionário aplicado na Investigação Prospectiva Europeia de Nutrição em Saúde e Câncer (EPIC) onde 3221 indivíduos, entre homens e mulheres de meia idade, responderam um Inquérito Recordatório de 24h, assim como um questionário local de frequência alimentar respondido por 459 pessoas em Barcelona. Neste último os participantes foram questionados sobre seus hábitos alimentares, como método de cozimento, uso de gordura, uso de resíduos de cozimento para fazer molhos, consumo de carne, pele de carne, aves e peixe, peso e frequência de consumo. Além disso, os participantes indicaram a preferência para o grau de escurecimento de superfície e ponto da carne. As análises das amostras indicaram que Glu-P-2 estava abaixo do limite de detecção para todas as amostras e a Glu-P-1 foi apenas detectada em lombo suíno frito mas estava abaixo do LOQ de 0,4 ng.g⁻¹. Resultados semelhantes foram observados para a MeIQ, apenas detectadas em salsicha suína frita e filé de frango grelhado e para a IQ, somente detectada em lombo suíno. Trp-P-1 e Trp-P-2, foram detectadas em hambúrgueres bovinos, lombo suíno e cordeiro, porém somente a Trp-P-2 foi quantificada em bife bovino grelhado (0,6 ng.g⁻¹) e

somente a Trp-P-1 detectada em filé de frango grelhado. A 7,8-DiMeIQx foi quantificada somente em lombo suíno ($0,4 \text{ ng.g}^{-1}$) e apenas detectada em hambúrguer frito e filé de peito grelhado. As aminas com maior incidência neste estudo foram DMIP, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, Norharman, Harman, PhIP, AαC e MeAαC. A PhIP foi quantificada em todas as amostras, com exceção da salsicha suína, e os resultados variaram entre $<0,2$ a $46,9 \text{ ng.g}^{-1}$, sendo a maior concentração encontrada no filé de frango frito. MeIQx foi encontrada em maior concentração em bife bovino grelhado ($2,9 \text{ ng.g}^{-1}$) e nas demais amostras os valores variaram entre não detectado a $1,9 \text{ ng.g}^{-1}$. A 4,8-DiMeIQx foi encontrada em maior concentração na carne de cordeiro grelhada ($1,8 \text{ ng.g}^{-1}$), nos demais alimentos a concentração variou entre $< 0,1$ e $1,1 \text{ ng.g}^{-1}$. Harman ($1,1$ a $7,5 \text{ ng.g}^{-1}$) e Nonharman ($0,3$ a $41,2 \text{ ng.g}^{-1}$) apresentaram níveis quantificáveis em todas as amostras, sendo as concentrações mais elevadas presentes em filé de frango frito e filé bovino grelhado, respectivamente. DMIP foi quantificada nas concentrações de $1,9$, $3,9$ e $29,7 \text{ ng.g}^{-1}$ em filé frango grelhado, lombo suíno e filé de frango frito, respectivamente. A partir dos dados de concentração nas amostras e consumo dos alimentos, a estimativa de ingestão total média de AHAs pela população espanhola foi de 606 ng.dia^{-1} excluindo as concentrações dos comutagênicos Harman e Nonharman. Considerando os comutagênicos, a estimativa de ingestão total média de AHAs pela população é elevada a 934 ng.dia^{-1} . Os alimentos de maior contribuição para a ingestão foi o filé de frango frito (507 ng.dia^{-1}) seguido pelo filé bovino (131 ng.dia^{-1}), hambúrguer frito (75 ng.dia^{-1}) e lombo suíno frito (74 ng.dia^{-1}).

A estimativa de exposição diária da população dos Estados Unidos da América a PhIP e MeIQx presentes em diferentes tipos de carnes foi realizada recentemente.⁶³ Os autores compilaram os resultados de concentração das aminas de estudos que determinaram experimentalmente as concentrações das aminas em carnes bovina, ave, suína e frutos do mar usando diferentes tipos de preparo (assado, frito, grelhado, defumado, micro-ondas e cru). As concentrações médias das aminas nestes alimentos foram utilizadas juntamente com os dados da Pesquisa Nacional de Saúde e Exame Nutricional na determinação da estimativa de exposição. Para população total a exposição média foi estimada em $565,3 \text{ ng.dia}^{-1}$, sendo $473,6 \text{ ng.dia}^{-1}$ correspondentes a PhIP e $91,75 \text{ ng.dia}^{-1}$ a MeIQx. A exposição às AHAs para os altos consumidores de carne, ou seja, percentil 80 e 95, foi estimada em $403,73$ e $726,88 \text{ ng.dia}^{-1}$.

1.7. Estudos sobre a presença de Aminas Heterocíclicas Aromáticas em alimentos no Brasil

No Brasil, os estudos relacionados às AHAs são escassos. Iwasaki et al. (2010) avaliaram a formação das AHAs em carne bovina, suína, frango e peixe preparados como fritura, grelhados e assados na churrasqueira, em diversos níveis de cozimento.⁶⁴ Os autores relataram que os níveis de PhIP, MeIQx e 4,8-DiMeIQx aumentaram levemente nas carnes bovina e de peixe bem passadas. Os níveis de AHAs variaram entre os métodos de cocção: a concentração de PhIP em carne bovina bem passada foi maior quando preparada na forma de churrasco, sendo $31,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$, em comparação a $16,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ encontrada na carne grelhada e $0,58 \mu\text{g.kg}^{-1}$ na carne frita. Quando os tipos de carne foram comparados, a carne de frango apresentou maior concentração de AHAs. A concentração de PhIP em amostra bem passada foi $34,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para carne de frango com pele, $0,58 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para carne bovina, $7,25 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para carne de porco, $2,28 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para sardinha e $7,37 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para salmão.

Sharma et al. (2009) desenvolveram um questionário de frequência alimentar para realizar estimativas de ingestão das AHAs.⁶⁵ Carvalho et al. (2016) avaliaram a relação entre o consumo de frutas, vegetais e AHAs com os danos causados ao DNA, medido pela determinação da 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG).⁶⁶ Os pesquisadores concluíram que o baixo consumo de frutas e o alto consumo de AHAs estão associados aos danos causados ao DNA.

Não existem até o momento limites máximos de concentração estabelecidos para as aminas heterocíclicas aromáticas em alimentos no Brasil.

5. CONCLUSÕES

O método analítico escolhido e validado mostrou-se adequado para a determinação das aminas heterocíclicas aromáticas selecionadas para este estudo. Pode-se mencionar que o maior inconveniente para a aplicação do método analítico é o elevado número de etapas necessárias para obtenção do extrato final, além do longo tempo despendido. A ausência de um sistema de extração em fase sólida automatizado também dificultou a aplicação do método.

Os resultados obtidos demonstraram o maior consumo de alimentos cárneos para as faixas etárias entre 18 e 29 anos para mulheres e 18 a 49 anos para homens, quando comparados com as mulheres acima de 50 anos. Para a estimativa de ingestão de AHAs, os dados obtidos para as mulheres acima de 50 anos são apenas estatisticamente diferentes daqueles observados para os homens entre 18 e 39 anos.

Entre os alimentos analisados, o que apresentou maior contribuição para a ingestão das AHAs foi o filé de frango grelhado, pois além de conter as maiores concentrações de AHAs totais e maior incidência, também é um dos alimentos cárneos mais consumidos de acordo com os relatos da população participante do estudo.

Quando os dados são comparados aos estudos reportados na literatura mundial, os resultados obtidos para a ingestão das AHAs neste projeto são menores à maioria desses estudos. Um dos motivos pode ser os níveis menores de AHAs encontrados nas amostras coletadas em Ribeirão Preto, possivelmente ocasionadas pelo modo de preparo e uso de temperos que inibem a formação destes compostos.

Pode-se citar como limitação desta pesquisa a avaliação de uma parcela dos alimentos cárneos e a não realização de coleta de alimentos tão amplas como as empregadas em Estudos de Dieta Total. Entretanto, as estimativas aqui apresentadas são relevantes e indicadoras de que existe a necessidade de avaliações futuras mais abrangentes, especialmente com maior variedade de amostras e tipo de alimentos. Este trabalho apresentou a estimativa de exposição às AHAs com dados obtidos de participantes residentes na cidade de Ribeirão Preto, cujos hábitos alimentares e renda per capita não são representativos de toda a população brasileira.

Como estudos futuros, sugere-se também a realização de estudos semelhantes em outras regiões brasileiras com hábitos alimentares distintos.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) BRASIL. EMBRAPA. Qualidade da Carne. 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne>>. Acesso em: 14 mar. 2019.
- 2) BRAGAGNOLO, N. II Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne colesterol. 2001
- 3) BOUVARD, Véronique et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology*, [s.l.], v. 16, n. 16, p.1599-1600, dez. 2015. Elsevier BV
- 4) ALAEJOS, M. Sanz et al. Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods. *Journal of Chromatography B*, v. 862, n. 1-2, p. 15-42, 2008.
- 5) JÄGERSTAD, M. et al. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, v. 207, n. 6, p. 419-427, 1998.
- 6) Janoszka, B.; Blaszczyk, U.; Damasiewicz-Bodzek, A.; Sajewicz, M. Analysis of heterocyclic amines (HAs) in pan-fried pork meat and its gravy by liquid chromatography with diode array detection. *Food Chem.* 2009, 113, 1188–1196.
- 7) IARC. IARC's Mission: Cancer research for cancer prevention. 2019. Disponível
- 8) IARC. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–123. 2019. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>>. Acesso em: 01 maio 2019.
- 9) MARTINS, Sara IFS; JONGEN, Wim MF; VAN BOEKEL, Martinus AJS. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. **Trends in food science & technology**, v. 11, n. 9-10, p. 364-373, 2000.
- 10) NOOSHKAM, Majid; VARIDI, Mehdi; BASHASH, Moein. The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. **Food chemistry**, v. 275, p. 644–660, 2019.
- 11) GIBIS, Monika. Heterocyclic aromatic amines in cooked meat products: Causes, formation, occurrence, and risk assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 269-302, 2016.
- 12) ZÖCHLING, Siegfried; MURKOVIC, Michael. Formation of the heterocyclic aromatic amine PhIP: identification of precursors and intermediates. **Food chemistry**, v. 79, n. 1, p. 125-134, 2002.
- 13) PAN, Han et al. Heterocyclic aromatic amines in meat products consumed in China. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 2089-2095, 2014.
- 14) GIBIS, Monika; WEISS, Jochen. Inhibitory effect of cellulose fibers on the formation of heterocyclic aromatic amines in grilled beef patties. **Food chemistry**, v. 229, p. 828-836, 2017.
- 15) SHIN, H. S. et al. Reduction of heterocyclic aromatic amine formation and overall mutagenicity in fried ground beef patties by organosulfur compounds. **Journal of food science**, v. 67, n. 9, p. 3304-3308, 2002.

- 16) TURESKY, R. J. The role of genetic polymorphisms in metabolism of carcinogenic heterocyclic aromatic amines. **Current drug metabolism**, v. 5, n. 2, p. 169-180, 2004.
- 17) OGA, Seizi; CAMARGO, Márcia Maria de Almeida; BATISTUZZO, José Antonio de Oliveira. **Fundamentos de toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2014. 704 p
- 18) TURESKY, Robert J.; LE MARCHAND, Loic. Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: lessons learned from aromatic amines. **Chemical research in toxicology**, v. 24, n. 8, p. 1169-1214, 2011.
- 19) TURESKY, Robert J. et al. Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2. **Chemical research in toxicology**, v. 11, n. 8, p. 925-936, 1998.
- 20) HEIN, David W. et al. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 9, n. 1, p. 29-42, 2000.
- 21) COSTA, Mariana de Pinho Oliveira. Aminas Aromáticas Heterocíclicas em sardinha e salmão grelhados: Influência do processamento culinário. 2011.
- 22) CHIANG, Vic Shao-Chih; QUEK, Siew-Young. The relationship of red meat with cancer: effects of thermal processing and related physiological mechanisms. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1153-1173, 2017.
- 23) CHEVEREAU, Matthieu et al. Role of human sulfotransferase 1A1 and N-acetyltransferase 2 in the metabolic activation of 16 heterocyclic amines and related heterocyclics to genotoxicants in recombinant V79 cells. **Archives of toxicology**, v. 91, n. 9, p. 3175-3184, 2017.
- 24) DOS SANTOS, Elaine Cristina Lima et al. Polimorfismos no gene NAT2 (N-acetiltransferase 2) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 6, p. 521-529, 2016.
- 25) PAUL, Priscilla et al. Recent advances in sulfotransferase enzyme activity assays. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 403, n. 6, p. 1491-1500, 2012.
- 26) CARVALHO, Aline Martins. **Consumo de carne e aminas heterocíclicas como fatores de risco para o câncer**. 2016. 83 f. Tese (Doutorado) - Curso de Nutrição em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6138/tde-04012017-104250/publico/AlineMartinsCarvalhoRestritasimplificada.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2019.
- 27) CAI, Tingting; YAO, Lihua; TURESKY, Robert J. Bioactivation of heterocyclic aromatic amines by UDP glucuronosyltransferases. **Chemical research in toxicology**, v. 29, n. 5, p. 879-891, 2016.
- 28) TURESKY, Robert J. et al. Metabolism of heterocyclic aromatic amines by human hepatocytes and cytochrome P4501A2. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 506, p. 187-195, 2002.
- 29) MOTA, Claudio JA. Nitrenium ions. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 453-458, 1998.
- 30) BARREIROS, André Luís Bacelar Silva; DAVID, Jorge Mauricio; DAVID, Juceni Pereira de Lima. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. 2006.

- 31) TURESKY, Robert J. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. **Toxicology letters**, v. 168, n. 3, p. 219-227, 2007.
- 32) TURESKY, R. J. The role of genetic polymorphisms in metabolism of carcinogenic heterocyclic aromatic amines. **Current drug metabolism**, v. 5, n. 2, p. 169-180, 2004.
- 33) HØIE, Anja Hortemo et al. DNA adducts induced by food mutagen PhIP in a mouse model expressing human sulfotransferases 1A1 and 1A2. **Toxicology letters**, v. 248, p. 34-38, 2016.
- 34) TANG, Yijin et al. UDP-glucuronosyltransferase-mediated metabolic activation of the tobacco carcinogen 2-amino-9H-pyrido [2, 3-b] indole. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 18, p. 14960-14972, 2012.
- 35) MACIT, Arife; KIZIL, Mevlude. Effect of olive leaf extract marination on heterocyclic aromatic amine formation in pan-fried salmon. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 9, p. 3908-3915, 2022.
- 36) DAMAŠIUS, J. et al. Assessment of the influence of some spice extracts on the formation of heterocyclic amines in meat. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 149-156, 2011.
- 37) SMITH, J. S.; AMERI, F.; GADGIL, P. Effect of marinades on the formation of heterocyclic amines in grilled beef steaks. **Journal of food science**, v. 73, n. 6, p. T100-T105, 2008.
- 38) GIBIS, Monika. Effect of oil marinades with garlic, onion, and lemon juice on the formation of heterocyclic aromatic amines in fried beef patties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10240- 10247, 2007.
- 39) GIBIS, Monika; KRUWINNUS, Miriam; WEISS, Jochen. Impact of different pan-frying conditions on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality in fried bacon. **Food chemistry**, v. 168, p. 383-389, 2015.
- 40) LEE, Jiyeong et al. Influence of extra virgin olive oil on the formation of heterocyclic amines in roasted beef steak. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 159-165, 2011.
- 41) KHAN, Mohammad Rizwan. Influence of food condiments on the formation of carcinogenic heterocyclic amines in cooked chicken and determination by LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 3, p. 307-314, 2015.
- 42) SZTERK, Arkadiusz; JESIONKOWSKA, Katarzyna. Influence of the cold storage time of raw beef meat and grilling parameters on sensory quality and content of heterocyclic aromatic amines. **LWT-Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 299-308, 2015.
- 43) PUANGSOMBAT, Kanithaporn; SMITH, J. Scott. Inhibition of heterocyclic amine formation in beef patties by ethanolic extracts of rosemary. **Journal of food science**, v. 75, n. 2, p. T40-T47, 2010.
- 44) ZENG, Maomao et al. Inhibitory profiles of chilli pepper and capsaicin on heterocyclic amine formation in roast beef patties. **Food chemistry**, v. 221, p. 404-411, 2017.
- 45) OZ, Fatih; KAYA, Mukerrem. The inhibitory effect of black pepper on formation of heterocyclic aromatic amines in high-fat meatball. **Food Control**, v. 22, n. 3-4, p. 596-600, 2011.

- 46) OZ, Fatih; CAKMAK, Isa Han. The effects of conjugated linoleic acid usage in meatball production on the formation of heterocyclic aromatic amines. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 1031-1037, 2016.
- 47) YU, Di; CHEN, Ming-Shun; YU, Shu-Juan. Effect of sugarcane molasses extract on the formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP) in a model system. **Food chemistry**, v. 197, p. 924-929, 2016.
- 48) INCA . ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: Cedc, 2011. 127 p. <http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/abc_do_cancer_2ed.pdf> . Acesso em: 20 ago. 2020.
- 49) OMS. Câncer. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 20 abr. 2020.
- 50) BERTTONI, Fabiana. Metabolismo do DNA e mutações. In: LOPES, Ademar; CHAMMAS, Roger; IYEYASU, Hirofumi. Oncologia para a graduação. 3. ed. São Paulo: Lemar, 2013. Cap. 2. p. 30-37.
- 51) SANTOS, Sofia Nascimento dos. Biologia Tumoral. In: LOPES, Ademar; CHAMMAS, Roger; IYEYASU, Hirofumi. Oncologia para a graduação. 3. ed. São Paulo: Lemar, 2013. Cap. 1. p. 23-29.
- 52) TURESKY, Robert J.; LE MARCHAND, Loic. Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: lessons learned from aromatic amines. **Chemical research in toxicology**, v. 24, n. 8, p. 1169-1214, 2011.
- 53) SUGIMURA, Takashi et al. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. **Cancer science**, v. 95, n. 4, p. 290-299, 2004.
- 54) JAEGERSTAD, Margaretha; SKOG, Kerstin. Genotoxicity of heat-processed foods. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 574, n. 1-2, p. 156-172, 2005.
- 55) SONCU, Eda Demirok; HASKARACA, Güliz; KOLSARICI, Nuray. Presence of acrylamide and heterocyclic aromatic amines in breaded chicken meat products and dietary exposure of Turkish population from Ankara based on the food frequency questionnaire study. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 3, p. 501-511, 2018.
- 56) REARTES, Gabriela Angelina et al. Cooking methods and the formation of PhIP (2-Amino, 1-methyl, 6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine) in the crust of the habitually consumed meat in Argentina. **Food and Chemical Toxicology**, v. 92, p. 88-93, 2016.
- 57) KEATING, G. A.; BOGEN, K. T. Estimates of heterocyclic amine intake in the US population. **Journal of Chromatography B**, v. 802, n. 1, p. 127-133, 2004.
- 58) BYRNE, Celia et al. Predictors of dietary heterocyclic amine intake in three prospective cohorts. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 7, n. 6, p. 523-529, 1998.
- 59) LAYTON, David W. et al. Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 1, p. 39-52, 1995.
- 60) LU, Fei; KUHNLE, Gunter K.; CHENG, Qiaofen. Heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial ready-to-eat meat products on UK market. **Food Control**, v. 73, p. 306-315, 2017.

- 61) JAHURUL, M. H. A. et al. Dietary exposure to heterocyclic amines in high-temperature cooked meat and fish in Malaysia. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 8, p. 1060-1071, 2010.
- 62) BUSQUETS, Rosa et al. Occurrence of heterocyclic amines in several home-cooked meat dishes of the Spanish diet. **Journal of Chromatography B**, v. 802, n. 1, p. 79-86, 2004
- 63) POUZOU, Jane G.; COSTARD, Solenne; ZAGMUTT, Francisco J. Probabilistic assessment of dietary exposure to heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons from consumption of meats and breads in the United States. **Food and Chemical Toxicology**, v. 114, p. 361-374, 2018.
- 64) IWASAKI, Motoki et al. Heterocyclic amines content of meat and fish cooked by Brazilian methods. **Journal of Food Composition and analysis**, v. 23, n. 1, p. 61-69, 2010.
- 65) SHARMA, Sangita et al. Development of a quantitative food frequency questionnaire for assessing food, nutrient, and heterocyclic aromatic amines intake in Japanese Brazilians for a colorectal adenoma case–control study. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 60, n. sup7, p. 128-139, 2009.
- 66) DE CARVALHO, Aline Martins et al. Joint association of fruit, vegetable, and heterocyclic amine intake with DNA damage levels in a general population. **Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 260-264, 2016.

