

DM

USAMET/UHPLC-FLR
Como nova abordagem analítica
para a quantificação de aminas biogénicas em tunídeos
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Joanna Karina Gouveia Pataca
MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

Fevereiro | 2019

USAMET/UHPLC-FLR

Como nova abordagem analítica
para a quantificação de aminas biogénicas em
tunídeos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Joanna Karina Gouveia Pataca

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADOR

José de Sousa Câmara

CO-ORIENTADORA

Helena Caldeira Araújo



USAMET/UHPLC-FLR como nova abordagem analítica para a quantificação de aminas biogénicas em tunídeos

Dissertação de Mestrado

Joanna Karina Gouveia Pataca

Mestrado em Bioquímica Aplicada

Orientador

Professor Doutor José de Sousa Câmara

Co-orientadora

Professora Doutora Helena Caldeira Araújo

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Na elaboração da presente tese de mestrado aprez-me agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor José S. Câmara, pela oportunidade dada, de modo a realizar e experienciar tão importante tarefa e ainda pela disponibilidade, apoio e compreensão demonstrados ao longo do seu desenvolvimento.

Agradeço à minha co-orientadora, Professora Doutora Helena C. Araújo, pela dedicação e suporte prestado ao longo deste trabalho.

Agradeço também ao Doutor Jorge Pereira por todo o apoio, disponibilidade e dedicação evidenciados.

Agradeço igualmente à Mestre Priscilla Porto-Figueira, pelo tempo despendido, ajuda e apoio concedido ao longo deste trabalho.

Ainda um agradecimento à Professora Doutora Helena Tomás, pela atenção, colaboração, disponibilidade e apoio prestados.

Gostaria ainda de agradecer aos meus colegas Natacha Antunes, José Figueira, Pedro Berenguer, Ana Freitas, Anísia Martins e Catarina Cruz pelas palavras de apoio, pela motivação dada e por todos os momentos de convívio que partilhamos.

Agradeço igualmente aos meus pais, aos meus avós e ao Miguel pela paciência, companheirismo, apoio incondicional, incentivo e força transmitidos durante a efetivação de todo este trabalho.

E receando a omissão dos que efetivamente colaboraram nesta considerável e árdua missão, ressalvo aqui o meu sincero e sentido agradecimento a todos quantos, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a minha formação académica, para o meu crescimento enquanto pessoa e ainda para os resultados então alcançados.

Este trabalho foi suportado por diferentes entidades, nomeadamente, pela FCT-Fundação para a Ciência e a Tecnologia (projeto PEst-OE/QUI/UI0674/2013, CQM, fundos do governo Português), através do programa Madeira 14-20, projeto

PROEQUIPRAM – Reforço do Investimento em Equipamentos e Infraestruturas Científicas na RAM (M1420-01-0145-FEDER-000008) e pela ARDITI – Agência Regional para o Desenvolvimento da Investigação, Tecnologia e Inovação, através do projeto M1420-01-0145-FEDER-000005 – Centro de Química da Madeira – CQM+ (Madeira 14-20).

Publicações científicas

No decorrer do presente trabalho de dissertação foi possível participar em publicações científicas através da participação num capítulo de um livro, dois posters e duas comunicações orais.

Capítulo de livro

Jorge A. Pereira, Priscilla Porto-Figueira, Beatriz Andrade, Patrícia Gonçalves, Joanna Pataca, José S. Câmara (2017). Chapter 1. *Biogenic Amines in Food: Occurrence and Analytical Challenges for Their Analysis*. In Joanna Stadnik (Ed), *Biogenic Amines (BA): Origins, Biological Importance and Human Health Implications* (pp. 233-268). Nova Science Publishers.

Posters

Jorge A. Pereira, Joanna Pataca, Cátia Vieira, Priscilla Porto-Figueira, José S. Câmara. *Microextraction and Analysis of Biogenic Amines in Foodstuffs*, ISSS 2017, 23rd International Symposium on Separation Science. Vienna, Austria. September 2017. (ISBN: 978-3-9504017-7-6).

Joanna Pataca, Priscilla Porto-Figueira, Jorge A. Pereira, José S. Câmara. *USAMET, an improved technique for the isolation of biogenic amines from tuna fish*. XIV Encontro de Química dos Alimentos. Viana do Castelo. November 2018.

Comunicações orais

Priscilla Porto-Figueira, Joanna Pataca, Jorge A. Pereira, Helena Caldeira, José S. Câmara. *An Improved USAME Technique Combined with UPLC-FLR for Quantification of Biogenic Amines in Tuna Fish*. ExTech 2018, 20th International Symposium on Advances in Extraction Technologies. Iowa, United States. June 2018.

Jorge Pereira, Joanna Pataca, Priscilla Porto-Figueira, Helena Caldeira, José S. Câmara. *Ultrasound-assisted microextraction as an improved approach for the isolation of biogenic amines from foodstuffs*. 3th Sample Treatment. Lisbon. December 2018

Resumo

O crescente número de casos de intoxicações alimentares, motivadas pela presença de amins biogénicas (ABs), tem originado uma crescente preocupação a nível da segurança alimentar. Neste contexto, este trabalho teve como principal objetivo a determinação quantitativa e qualitativa de ABs (triptamina, cadaverina, putrescina, espermina, histamina, tiramina e espermidina) presentes em diferentes amostras de tunídeos, através da microextração assistida por ultrassons (USAMET), seguida da derivatização com cloreto de dansilo (DnsCl) e da análise por cromatografia líquida de ultra pressão, com deteção por fluorescência (UHPLC-FLR), usando um gradiente trifásico (ácido fosfórico (0,1%): metanol (100%): acetonitrilo (100%)), com um fluxo de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Para a otimização do processo extrativo testaram-se diferentes condições experimentais, nomeadamente, o tempo de agitação por ultrassons (US), (1, 5, 10min) e a natureza do solvente extrator (acetonitrilo e metanol). Similarmente foram testados diferentes parâmetros analíticos, com influência no processo de derivatização com DnsCl, incluindo a concentração do DnsCl (1, 2, 3 g/L), o tempo de derivatização sem agitação e com agitação por US (10 e 20 min) e ainda a temperatura de derivatização (temperatura ambiente, 40, 60 °C).

A validação da performance do método analítico foi realizada pela determinação da seletividade, linearidade, limite de deteção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e ainda efeito de matriz (EM).

Relativamente à linearidade obtiveram-se valores do coeficiente de correlação (R^2) superiores a 0,9809. Os resultados da percentagem de recuperação foram satisfatórios variando entre 76-106%. O LOD variou de 0,98 mg/kg (putrescina) a 8,57 mg/kg (tiramina), enquanto o LOQ variou de 3,20 mg/kg (putrescina) a 25,64 mg/kg (tiramina). Os resultados revelaram uma precisão elevada com valores de precisão intradia, a variarem entre 5,24-11,64%, e de precisão interdia a oscilarem entre 8,21-14,20%. Relativamente ao EM, verifica-se que tem uma influência significativa no

processo extrativo, de acordo com os valores obtidos (2% para a espermina; 50% para a tiramina), para algumas das ABs em estudo.

A aplicação da metodologia validada a diferentes amostras de atum (posta de atum fresca, bife de atum congelado, paté de atum, atum em conserva de azeite, atum conservado em óleo e atum em conserva ao natural) revelou a ausência da maioria das ABs em estudo e níveis de histamina abaixo do limite máximo de 500 mg/kg estipulado pela *Food and Drugs Administration* (FDA).

Palavras-chave: Aminas biogénicas, *Thunnus Obesus*, USAMET, Cloreto de Dansilo, UHPLC-FLR; Validação.

Abstract

The increasing number of cases that induce food poisoning due to the presence of biogenic amines (ABs) in food has given rise to a growing concern about food safety. In this context, the main objective of this work was the quantitative and qualitative determination of ABs (tryptamine, cadaverine, putrescine, spermine, histamine, tyramine and spermidine) present in different tuna samples through ultrasound-assisted microextraction (USAMET), followed by derivatization with dansyl chloride (DnsCl) and analysis by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection (UHPLC-FLR) using a three-phase gradient (phosphoric acid (0.1%): methanol (100%):acetonitrile (100%)) and a flow rate of 200 μ L/min.

For the optimization of the extraction process, different experimental conditions were tested, namely ultrasonic agitation time (1, 5, 10 min) and the nature of the extracting solvent (acetonitrile and methanol). Similarly, different analytical parameters influencing the DnsCl derivatization process were optimized, including the concentration of DnsCl (1, 2, 3 g/L), derivatization time without stirring and ultrasonic agitation (10, 20 min) and derivatizing temperature (ambient temperature, 40, 60 °C).

For the validation of the analytical method, the evaluation of parameters like selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision and matrix effect (ME) were taken into account.

Regarding to the correlation coefficients (R^2) the obtained values were above 0.9809, suggesting a good linearity between the analytes concentration and FLR signal. The results of the recovery were satisfactory ranging from 76-106%. The LOD ranged from 0.98 mg/kg (putrescine) to 8.57 mg/kg (tyramine), while LOQ ranged from 3.20 mg/kg (putrescine) to 25.64 mg/kg (tyramine). The results showed a good precision with intraday precision values varying between 5.24 to 11.64% and of interday precision between 8.21 to 14.20%. Regarding to matrix, a significant influence on the extractive process was shown, according to the values obtained for ME for some of the ABs under study (i.e. 2% for spermine, 50% for tyramine).

The application of the validated methodology to different tuna samples (fresh tuna steak, frozen tuna steak, tuna pate, canned tuna of oil, preserved tuna in oil and canned tuna in the wild) revealed the absence of most ABs in study and Histamine levels below the maximum limit of 500 mg/kg stipulated by the *Food and Drugs Administration* (FDA).

Keywords: Biogenic amines, *Thunnus Obesus*, USAMET, Dansyl Chloride, UHPLC-FLR; Validation.

Lista de Abreviaturas

Símbolos	g	Grama
	°C	Graus Celsius
	h	Hora
	L	Litro
	µL	Microlitro
	µm	Micrómetro
	mL	Mililitro
	mm	Milímetro
	min	Minuto
	M	Molar
	mol	Mole
	nm	Nanómetro
	%	Percentagem
	pH	Potencial de hidrogénio
	kg	Quilograma
	km	Quilómetro
	rpm	Rotações por minuto
A	ABs	Aminas Biogénicas
	ACE	Acetona
	ACN	Acetonitrilo
	A _w	Atividade da água
B	BEH	Etileno híbrido interconectado
	BzCl	Cloreto de Benzoílo
C	Cad	Cadaverina
	CAC	Codex Alimentarius Commission
	CSH	Carga superfície incorporada
D	DAO	Diaminoxidases
	DnsCl	Cloreto de dansilo

E	EFSA	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar
	EM	Efeito de matriz
F	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
	FLR	Detetor de fluorescência
G	GC	Cromatografia em fase gasosa
H	His	Histamina
	HPLC	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
I	IC	Cromatografia de permuta iónica
	IQ	Índice de qualidade
L	LLE	Extração líquido-líquido
	LOD	Limite de deteção
	LOQ	Limite de quantificação
M	MAO	Monoaminoxidases
	MeOH	Metanol
O	OPA	Orto-ftaldeído
P	PDA	Detetor de conjunto de fotodíodos
	PI	Padrão interno
	PSA	Amina primária secundária
	Put	Putrescina
Q	QSM	Sistema de bombas quaternário
	QuEChERS	Rápida, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro.
	QIM	Método do índice de qualidade
R	RSD	Desvio padrão relativo
S	SLE	Extração sólido-líquido
	Ser	Serotonina
	SNC	Sistema nervoso central
	Spd	Espermidina
	SPE	Extração em fase sólida
	Spm	Espermina
	SPME	Microextração em fase sólida

	Tir	Tiramina
T	TLC	Cromatografia em camada fina
	Tri	Triptamina
	UE	União Europeia
	UHPLC	Cromatografia em fase líquida de ultra pressão
U	USAMET	Microextração Assistida por Ultrassons
	US	Ultrassons
	UV	Ultravioleta
W	WWF	World Wildlife Fund

Índice Geral

Agradecimentos.....	9
Publicações científicas	11
Resumo	13
Abstract	15
Lista de Abreviaturas	17
Índice Geral.....	21
Lista de Figuras	23
Lista de Tabelas	25
CAPÍTULO I INTRODUÇÃO	27
1 Introdução.....	29
1.1 A importância do pescado no consumo humano.....	30
1.1.1 Pesca na Europa Meridional	32
1.2 Aminas biogénicas	34
1.2.1 Definição e classificação	34
1.2.2 Formação das Aminas Biogénicas	35
1.2.3 Importância dos Microrganismos na formação das Aminas Biogénicas..	42
1.2.4 Importância da presença das Aminas Biogénicas nos alimentos.....	43
1.2.5 Dualidade dos efeitos das Aminas Biogénicas no homem	46
1.3 Metodologia para a quantificação das Aminas Biogénicas	48
1.3.1 Técnicas extrativas.....	49
1.3.2 Agentes derivatizantes	50
CAPÍTULO II PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	53
2 Materiais e métodos	55
2.1 Reagentes químicos e materiais	55

2.2	Preparação das soluções.....	56
2.3	Preparação das amostras.....	56
2.4	Procedimento extrativo	57
2.5	Derivatização com DnsCl.....	59
2.6	Condições cromatográficas.....	60
2.7	Validação do método analítico	61
CAPÍTULO III RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		63
3	Resultados e discussão	65
3.1	Otimização das condições de derivatização com DnsCl	65
3.2	Otimização das condições extrativas por USAMET	66
3.3	Otimização das condições cromatográficas	69
3.3.1	Comparação da sensibilidade entre os detetores PDA vs. FLR para as Aminas Biogénicas.....	69
3.3.2	Comparação da performance das colunas Acquity UPLC BEH C18 e Acquity UPLC CSH C18.....	70
3.3.3	Seleção da fase móvel	71
3.4	Validação da metodologia analítica para a determinação de Aminas Biogénicas no atum.....	72
3.5	Aplicação da metodologia para a determinação de Aminas Biogénicas em diferentes amostras de atum.....	75
CAPÍTULO IV CONCLUSÕES.....		79
4	Conclusões.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		83
ANEXOS		93

Lista de Figuras

Figura 1. Média anual do consumo de pescado, em kg/habitante, nos países da Europa meridional. Adaptado de <i>World Wildlife Fund</i> [23].	32
Figura 2. Percentagem da produção piscícola, através da aquacultura, dos vários países pertencentes a Europa Meridional. Adaptado de <i>World Wildlife Fund</i> [23].	33
Figura 3. Formação de uma amina biogénica (2) por descarboxilação de um aminoácido (1).....	35
Figura 4. Formação da His (2) através da descarboxilação da histidina (1).....	36
Figura 5. Formação da Cad (2) através da descarboxilação da lisina (1).	38
Figura 6. Formação da Put (2) através da descarboxilação da ornitina (1).	39
Figura 7. Formação da Spd (2) e da Spm (3) a partir da Put (1).....	40
Figura 8. Formação da Tir (2) através da descarboxilação da tirosina (1).	40
Figura 9. Formação da Tri (2) através da descarboxilação do triptofano (1).....	41
Figura 10. Reação de derivatização do DnsCl (1) com uma amina terciária (2) originando uma amina dansilada (3).	51
Figura 11. Representação da constituição de uma posta de atum.....	57
Figura 12. Influência da temperatura, concentração de DnsCl e tempo de US no processo de derivatização.....	65
Figura 13. Representação das condições utilizadas no processo extrativo, sem a utilização de sais e sem tampão.....	66
Figura 14. Representação das condições utilizadas no processo extrativo com a utilização de sais (NaCl e MgSO ₄) e sem tampão.....	67

Figura 15. Representação das condições utilizadas no processo extrativo com a utilização de sais (NaCl e MgSO ₄) e com tampão citrato.	68
Figura 16. Representação das condições utilizadas no processo extrativo com a utilização de sais (NaCl e MgSO ₄) e com tampão acetato.	68
Figura 17. Comparação da sensibilidade dos detetores FLR ($\lambda_{exc}=300nm$ e $\lambda_{emi}=500nm$) e PDA ($\lambda_{abs}=250nm$) para detecção das ABs.	70
Figura 18. Cromatograma de uma solução padrão de ABs após derivatização (coluna BEH C18 com detecção por FLR). Legenda: 1-DnsCl; 2-Tri; 3-Put; 4-Cad; 5-Spm; 6-His; 7-PI; 8-Tir; Spd.....	72
Figura 1.A. Comparação da separação das ABs nas colunas BEH e CSH, respetivamente. Legenda:1-DnsCl; 2-Tri; 3-Spd; 4-Put; 5-Cad; 6-His; 7- PI; 8-Tir; 9-Spm.....	95
Figura 2.A. Representação cromatográfica do tempo de retenção das ABs, confirmadas através da fortificação com a concentração de 20 g/L. Legenda: 1-DnsCl, 2-Tri, 3-Put, 4-Cad, 5-Spm, 6-His, 7-Tir, 8-Spd.	96
Figura 3.A. Curvas de calibração obtidas para cada uma das ABs.....	97

Lista de Tabelas

Tabela 1. Representação do QIM para avaliar a decomposição das características sensoriais do peixe (adaptado de [19–22]).	31
Tabela 2. Níveis de His presentes no pescado e as suas consequências na saúde humana. Adaptado de Cardozo et al. [3].	44
Tabela 3. Classificação de segurança alimentar segundo o IQ. Adaptado de Veciana-Nogués [58].	46
Tabela 4. Condições utilizadas para a otimização do processo extrativo das ABs.	58
Tabela 5. Parâmetros usados para a otimização das condições de derivatização com o DnsCl.	60
Tabela 6. Composição do gradiente de separação cromatográfica com fluxo de 0,200mL/min.	71
Tabela 7. Resultados da validação do processo analítico, nomeadamente, tempos de retenção, gama de concentrações, linearidade, LOD e LOQ das ABs.	73
Tabela 8. Valores obtidos para a determinação da precisão, exatidão e EM do método USAMET.	74
Tabela 9. Valores obtidos na determinação da concentração das ABs nas amostras de atum fresco e em conserva. Legenda: n.d.- não detetado.	75
Tabela 10. Valores obtidos na determinação do IQ nas amostras de atum enlatado. .	77

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1 Introdução

A presença de elevados níveis de Aminas Biogénicas (ABs) em matrizes alimentares resultam da descarboxilação dos aminoácidos, por ação microbiana, induzindo assim a deterioração dos alimentos com a conseqüente perda das suas características organolépticas, sendo um obstáculo à sua comercialização [1, 2]. O descarte de alimentos inadequados para o consumo humano provoca um desperdício alimentar, daí originando uma diminuição económica [3].

Na Espanha (2017) foram registados 154 casos de intoxicação alimentar, devido à ingestão de atum importado. O atum congelado, embalado em vácuo, apresentava um aumento dos níveis da concentração de histamina (His) resultantes, principalmente, das más condições de conservação. Após a deteção do surto todos os lotes distribuídos pela União Europeia (UE) foram retirados do mercado [4].

Deste modo, para garantir a qualidade e segurança alimentar, é necessário controlar e monitorizar todas as fases de processo a que o alimento será submetido, minimizando assim os efeitos prejudiciais para a saúde humana [5].

Para a identificação e quantificação das ABs nas matrizes alimentares recorre-se usualmente às técnicas cromatográficas [6]. A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) recomenda a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com derivatização pré ou pós-coluna e com deteção por fluorescência (FLR), ultravioleta (UV) ou eletroquímica [7].

Nesse sentido, a quantificação dos níveis de ABs tem demonstrado ser uma ferramenta importante, pois a sua deteção permite aferir a qualidade do pescado e ainda estudar os seus efeitos de toxicidade [8–10].

1.1 A importância do pescado no consumo humano

O peixe é um alimento com elevado valor nutricional e de fácil digestão, características que o tornam essencial na nossa alimentação [5, 11]. Ao consumo humano são destinados mais de 75% da produção, sendo que o restante é usado para a produção de óleos e farinhas à base de peixe [12]. O atum é a espécie de peixe mais importante a nível comercial no mundo, representando mais de 10% do comércio de alimentos do mar [13], sendo que em 2012 foram capturados cerca de 7 milhões de toneladas das várias espécies [14].

Os tunídeos pertencem à família *Scombridae* e ao género *Thunnus* que inclui oito espécies de atum, nomeadamente, *Thunnus thynnus*, *Thunnus orientalis*, *Thunnus maccoyii*, *Thunnus obesus*, *Thunnus albacares*, *Thunnus tonggol*, *Thunnus atlanticus* e *Thunnus alalunga* [13, 15]. Tais espécies possuem dois tipos de músculo, o branco e o vermelho [1, 16]. A diferenciação entre estes dois tipos de músculo está no facto do músculo vermelho possuir elevadas quantidades de mioglobina (81-99%) [17]. Nos tunídeos o músculo vermelho está localizado na parte interna junto à coluna vertebral e rodeado pelo músculo branco [1, 16]. A elevada proporção de músculo vermelho, permite-lhes nadar a altas velocidades (> 45 km/h), por longos períodos, e sem entrar em fadiga [16, 17]. Porém, em períodos curtos de atividade, é usado o músculo branco [16]. Deste modo, as suas características morfológicas permitem-lhes nadar por longos períodos e a altas velocidades [18].

Os escombrídeos possuem condições favoráveis à produção de ABs, devido aos elevados níveis de aminoácidos livres que detêm, em especial histidina. A formação de ABs pode ocorrer em qualquer etapa do seu processamento, podendo ser potenciadas por diversos fatores tais como a temperatura, o pH e a atividade da água (A_w) [18].

O peixe é considerado fresco quando possui as suas características sensoriais inalteradas, por qualquer tipo de processo conservativo. Assim, o peixe fresco deve apresentar um odor e sabor característicos, rigidez cadavérica, pigmentação viva, olhos límpidos, bem delineados e protuberantes, escamas brilhantes e aderentes, vísceras íntegras e diferenciadas e as guelras devem possuir uma tonalidade avermelhada [19–

22].

A partir da análise sensorial das características do peixe é possível realizar uma avaliação, tendo em vista a atribuição de uma classificação, a qual indica se o peixe está ou não deteriorado. Quanto maior a pontuação, maior a sua deterioração. Nessa perspectiva surgiu o Método do Índice de Qualidade (QIM), cujos parâmetros avaliados, características e pontuação estão representados na Tabela 1 [19–22].

Tabela 1. Representação do QIM para avaliar a decomposição das características sensoriais do peixe (adaptado de [19–22]).

Parâmetros	Características	Pontuação	
Aparência geral	Aspeto superficial	Cores vivas	0
		Cores opacas	1
		Cores desvanecidas	2
	Rigidez	Duro	0
		Flexível	1
		Mole	2
	Barriga	Firme	0
		Macia	1
		Inchada	2
	Cheiro	Fresco (algas)	0
		Neutro	1
		Rançoso	2
Olhos	Globo ocular	Límpido	0
		Ligeiramente opaca	1
		Opaco	2
	Forma	Convexa	0
		Plana	1
	Concava	2	
Guelras	Cor	Vermelho vivo	0
		Vermelho pálido	1
		Castanho	2
Soma da pontuação		0 – 14	

1.1.1 Pesca na Europa Meridional

A Europa meridional ou mediterrânea, constituída pela Croácia, França, Grécia, Itália, Eslovénia, Espanha e Portugal, é o maior consumidor mundial de peixe. Registos indicam que, no ano 2014 foram gastos 34,57 biliões de euros em peixe e derivados, correspondendo a 63% do valor total da UE [23].

Na Europa mediterrânea verifica-se que, em média, cada pessoa consome anualmente o equivalente a 33,4 kg de pescado, enquanto a média total na UE é de 22,9 kg *per capita* e a nível mundial a média é de 19,2 kg *per capita* [23].

Portugal é dos países com maior consumo anual de peixe, por habitante, perfazendo 56,8 kg, o que equivale, em média, a mais de 1 kg de pescado por semana, por habitante [23]. Por outro lado, a Espanha é o segundo país com maior consumo anual de pescado perfazendo 42,4 kg por habitante [23]. O consumo anual de pescado dos países constituintes da Europa meridional estão representados na Figura 1.

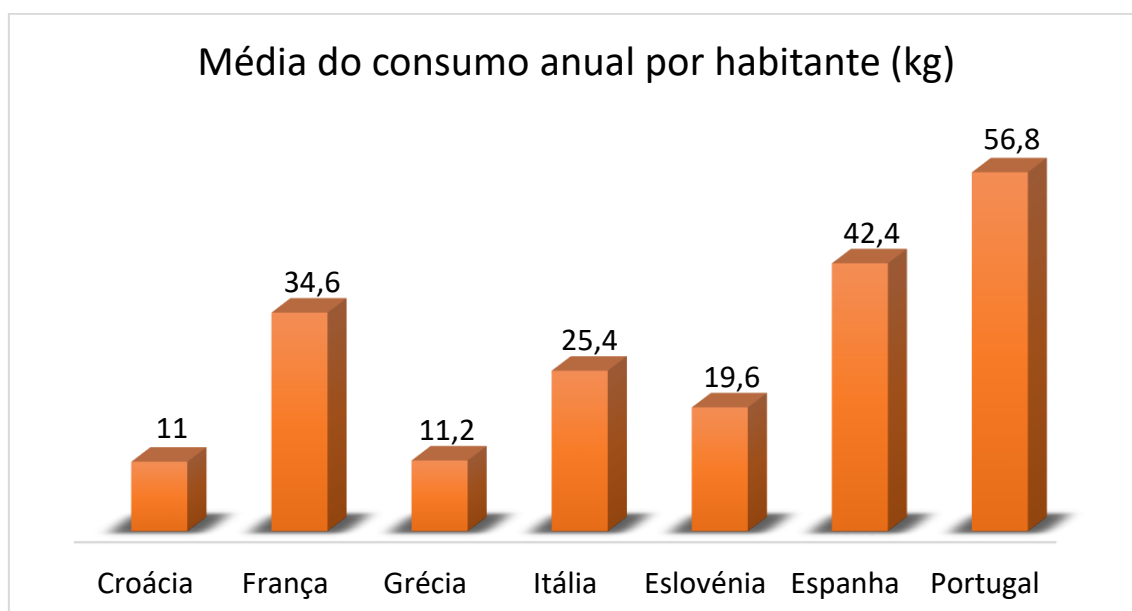


Figura 1. Média anual do consumo de pescado, em kg/habitante, nos países da Europa meridional. *Adaptado de World Wildlife Fund [23].*

O consumo crescente de pescado, devido aos benefícios associados na alimentação, induz o aumento da quantidade de peixe capturado. Todavia, tal aumento acarreta impactos ambientais negativos, sendo que 52% dos recursos marinhos mundiais são considerados como totalmente explorados e 28% considerados como esgotados, ou em vias de recuperação [12]. De salientar, igualmente, que a pesca excessiva não permite que as populações jovens deixem descendência, verificando-se assim uma diminuição acentuada dessas espécies, sendo que 93% das espécies se encontram ameaçadas [23].

Tendo em vista a manutenção ou o aumento do volume de peixe produzido sem sobre-exploração das espécies marinhas criou-se a aquacultura, alternativa ecologicamente correta, que beneficia as comunidades nas suas necessidades nutricionais [23]. Nesse âmbito e, a partir dos anos 70 do Séc. XX, a produção de peixes em cativeiro tem vindo a registar um aumento anual, em média de 8,7% [12]. A Europa meridional produz uma terça parte do volume de peixe criado em cativeiro. As percentagens de produção, nos vários países da Europa mediterrânea estão representadas na Figura 2 [23].

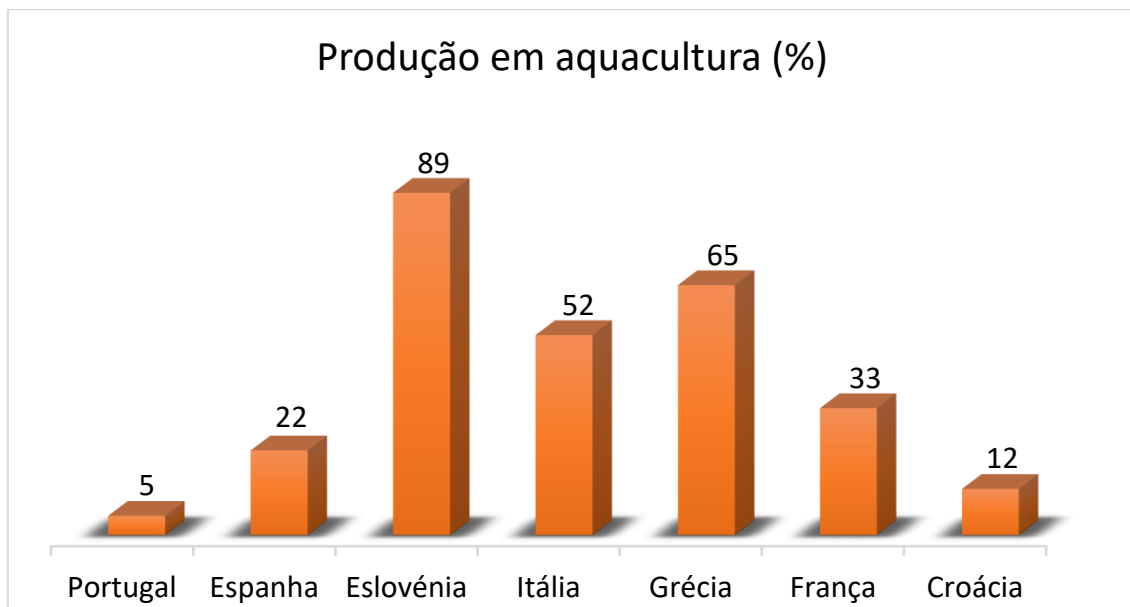


Figura 2. Percentagem da produção piscícola, através da aquacultura, dos vários países pertencentes a Europa Meridional. Adaptado de *World Wildlife Fund* [23].

1.2 Aminas biogénicas

1.2.1 Definição e classificação

As ABs são compostos orgânicos não voláteis de baixo peso molecular, com caráter básico, que possuem átomos de azoto na sua constituição [6, 7, 24–28]. São originadas a partir do metabolismo de aminoácidos, por microrganismos, plantas e animais, sendo sintetizadas em pequenas quantidades e possuindo funções fisiológicas essenciais [6, 7, 24, 28]. As ABs devem a sua denominação à respetiva origem biológica [3].

As ABs podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura química, o seu número de grupos amina e as suas funções fisiológicas [8]. Quanto à sua estrutura molecular, são designadas de alifáticas, heterocíclicas ou aromáticas. A putrescina (Put), a cadaverina (Cad), a espermidina (Spd) e a espermina (Spm) são classificadas de alifáticas. A His e a triptamina (Tri) são heterocíclicas, enquanto a tiramina (Tir) é uma amina aromática [7, 26, 28, 29]. De acordo com o número de grupos amina presentes na molécula, são classificadas de monoaminas (Tir), diaminas (Put, Cad e Tri) ou poliaminas (Spd, Spm e His) [29, 30]. Quanto à sua função fisiológica são classificadas de aminas vasoativas por atuarem no sistema vascular (Tir e Tri) e de aminas psicoativas por exercerem a sua ação no sistema nervoso (His, Put e Cad) [3, 29].

O tipo e a quantidade de ABs formadas nos diferentes alimentos devem-se à composição destes e ao tipo de microrganismos presentes [2]. As ABs são encontradas em elevadas quantidades, em vários alimentos deteriorados e fermentados e são formadas por descarboxilação dos aminoácidos, por ação bacteriana ou levuriana [24, 28]. Em geral os alimentos fermentados apresentam níveis de ABs mais elevados do que os alimentos não-fermentados [7].

1.2.2 Formação das Aminas Biogénicas

A presença de ABs no músculo de peixe fresco é reduzida. Em contrapartida, a decomposição do músculo aumenta a sua concentração, dada a sua riqueza em aminoácidos livres [31]. Existe um aumento do teor de ABs em carnes e peixes *post-mortem* devido à presença de enzimas proteolíticas no trato intestinal, em combinação com o processo autolítico [3]. Em particular, os escombrídeos proporcionam as condições adequadas para a formação de ABs, pois contêm níveis elevados de histidina [2, 18, 26].

Na atividade metabólica a formação e a degradação das ABs ocorre através da descarboxilação dos aminoácidos livres ou da aminação e transaminação de cetonas e aldeídos [7, 25, 27]. A descarboxilação corresponde à remoção do grupo carboxilo (Figura 3), originada endogenamente por enzimas, ou exogenamente, por microrganismos, através da libertação de enzimas do tipo descarboxilase [3, 32, 33]. Deste modo, as ABs são produzidas em menor quantidade pela via endógena, em comparação com aquelas que são produzidas por via exógena [3]. A descarboxilação é catalisada por enzimas que possuem como cofator o fosfato piridoxal [7]. Os produtos advindos da descarboxilação da histidina, tirosina, ornitina e lisina são respetivamente, His, Tir, Put e Cad [30].

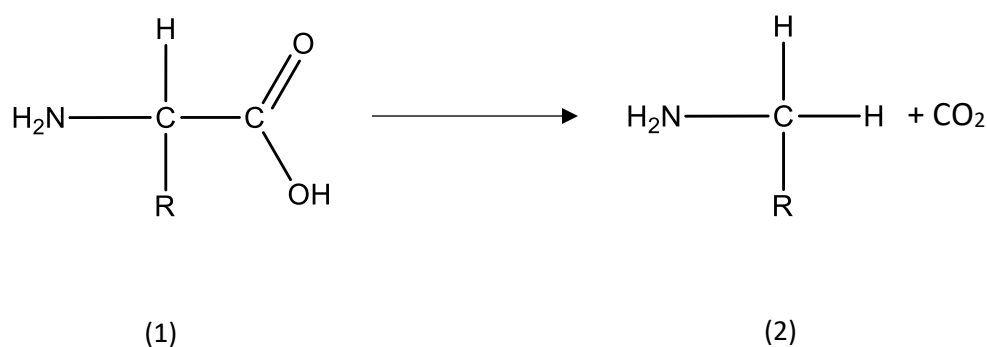


Figura 3. Formação de uma amina biogénica (2) por descarboxilação de um aminoácido (1).

A His ou 4-(2-aminoetil)-1H-imidzole encontra-se naturalmente presente no nosso organismo [24, 34]. Esta amina é resultante da descarboxilação da histidina, cujo mecanismo está representado na Figura 4. Possui a fórmula molecular $C_5H_9N_3$ e uma massa molar de 111,15 g/mol. Considerada como uma substância endógena, ela tem funções a nível da neuromodulação, da resposta imunológica e do controlo da secreção ácida gástrica [3, 25, 35]. A produção da His nos alimentos depende da temperatura, dos níveis da histidina livre e ainda da presença de descarboxilases [1].

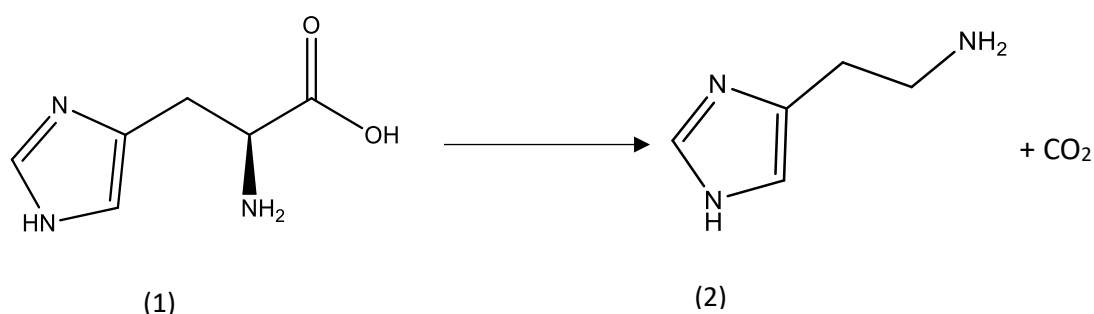


Figura 4. Formação da His (2) através da descarboxilação da histidina (1).

A produção da His nos músculos das espécies escombrídeos ocorre *post-mortem*, sendo que a sua presença é proporcional aos níveis de histidina presentes, uma vez que esta encontra-se na sua forma livre nos tecidos musculares [34, 36]. Através da descarboxilação bacteriana um aminoácido livre é facilmente convertido em His quando as condições de manuseamento e armazenamento são inadequadas, proporcionando a multiplicação de microrganismos que favoreçam a sua atividade [5].

A deterioração alimentar por ação bacteriana origina reações alérgicas e tóxicas, sendo que, alimentos ricos em His podem levar à intolerância e originar intoxicações alimentares [24, 30, 35]. Nessa perspetiva, o peixe fresco não contém His, dado que esta surge apenas no início da deterioração do peixe, ou então quando sujeito a elevadas temperaturas que favorecem a sua acumulação [37].

Os níveis de His variam consoante a temperatura de armazenamento do peixe. Baixas temperaturas conduzem à produção de níveis reduzidos de His, devido à presença de bactérias decompositoras, como a *Pseudomonas putida*, que consegue

decompor a His a baixas temperaturas. Contrariamente, as temperaturas elevadas (30 °C) originam o aumento dos níveis de His, devido à presença de bactérias mesófilas, como é o caso da *Morganella morganii* e do *Proteus vulgaris*, que produzem His e que ao 25 °C atingem o seu máximo de produção [25]. Assim é possível concluir que a formação da His está dependente da temperatura [38].

Segundo Al Bulushi *et al.* [25] a deterioração das propriedades organoléticas dos alimentos não está relacionada com a produção de His, pois o atum conservado a temperaturas entre 0-20 °C foi rejeitado com base nas suas características organoléticas, antes dos níveis de His presentes no peixe atingirem o nível de segurança (50 mg/kg) permitido pela FDA. Por outro lado, a comparação realizada sob as mesmas condições mas com sardinhas, não obstante se encontrarem em boas condições organoléticas, fez com que fossem rejeitadas por apresentarem níveis de His muito elevados [25].

A His está associada à intoxicação alimentar, que neste caso é denominada por intoxicação escombróide. É um tipo de intoxicação alimentar com sintomas e tratamento similar ao associado às alergias causadas por mariscos [34, 36]. A intoxicação resulta da ingestão de espécies como, sardinha, cavala, atum, anchova e arenque, pois são espécies que possuem teores elevados de histidina [34, 36]. O consumo de peixe mal processado, ocasionado pela exposição do peixe cru, por longos períodos, a temperaturas não adequadas, origina a formação de His por ação enzimática e bacteriana [34].

A ingestão de peixe que contenha valores de His superiores a 500 mg/kg produz intoxicação, entre dez a sessenta minutos após o consumo de peixe contaminado, sendo por vezes os sintomas confundidos com uma alergia alimentar ou com uma infeção por salmonela [3, 11, 34, 37]. Os sintomas associados a intoxicação por His caracterizam-se pelo paladar metálico ou picante, rápida e fraca pulsação, ou seja, baixa pressão arterial (hipotensão), dificuldade em engolir e ainda sede. Existem outros sintomas específicos, tais como dores de cabeça, vertigens, náuseas, vômitos, câibras abdominais, aumento das secreções pela mucosa gástrica, dores de estômago, diarreia e congestão nasal. Também podem surgir sintomas alérgicos, como urticária, erupção cutânea, rubor, inchaço facial e prurido [30, 34].

Os sintomas relacionados com o sistema nervoso central (SNC), como a ansiedade, são menos frequentes. Em geral estes sintomas desaparecem dentro de 24 horas, mas em casos raros podem durar vários dias. Esporadicamente foram observados problemas respiratórios e cardíacos. O tratamento para a intoxicação escombróide é através da administração de anti-histamínicos [34]. A contribuição de outras aminas como Cad, Put e Tir na intoxicação escombróide é desconhecido [35].

A toxicidade da His depende da capacidade da eficiência de desintoxicação do organismo. Caso exista apenas His, esta é eliminada através de enzimas (aminoxidases, principalmente a oxidase de diamina) que a metabolizam nos intestinos. Porém, na presença da Cad e Put essas enzimas são inibidas e os níveis de His no organismo aumentam, logo têm a capacidade de intensificar a toxicidade da His [7, 25]. A presença da His por si só não é considerada um indicador de degradação apropriado. Contudo, a presença das His, Put e Cad em simultâneo já pode ser considerada um indicador da deterioração alimentar [25].

A Cad ou 1,5-diaminopentano possui a fórmula molecular de $C_5H_{14}N_2$ e massa molecular 102,18 g/mol [39]. A lisina é o aminoácido precursor da Cad, que se origina através da descarboxilação (Figura 5) por bactérias ou fermentação, devido às más condições de manuseamento [6, 35, 36, 40].

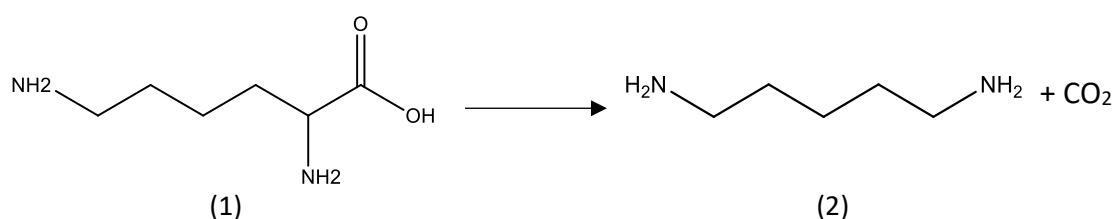


Figura 5. Formação da Cad (2) através da descarboxilação da lisina (1).

A Cad é uma amina maioritária em comparação a Put e Tir, sendo usada como indicador de decomposição do peixe, devido à sua deteção no estado inicial da decomposição [25]. Assim a Cad e a Put estão relacionadas com a produção de fortes e repulsivos odores cadavéricos que indicam a existência de contaminação bacteriana.

Porém, para alguns animais como ratos e insetos, estas diaminas têm um efeito atrativo, permitindo assim a colonização do cadáver [41].

Em geral os níveis de Cad são mais elevados do que os de His, a cinética de formação é mais rápida pelo que surge mais cedo no processo de deterioração e tem a capacidade de potenciar os níveis da His [7, 34, 35]. A formação da Cad não é inibida pelas baixas temperaturas, verificando-se um aumento acentuado da Cad em comparação com a His e a Tir, que não apresentam aumentos significativos a baixas temperaturas [25].

A Put ou 1,4-diaminobutano cuja fórmula molecular é $C_4H_{12}N_2$ (88,15 g/mol), resulta da descarboxilação do aminoácido ornitina (Figura 6) e é utilizada como indicador da deterioração, estando associada ao aparecimento de odores rançosos e pútridos [25, 26, 35, 36, 42, 43].

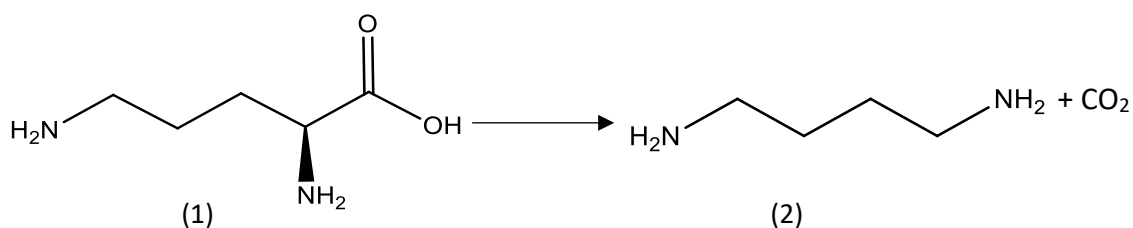


Figura 6. Formação da Put (2) através da descarboxilação da ornitina (1).

A Put só por si não origina intoxicação. No entanto, a sua presença conjunta com a Cad potencia a intoxicação pela His [25, 35]. Estas diaminas podem também desencadear problemas de saúde, mesmo na ausência de His [1].

A Spm possui a fórmula molecular $C_{10}H_{26}N_4$ e uma massa molecular de 202,34 g/mol [44], enquanto a Sdp possui a fórmula molecular $C_7H_{19}N_3$ e massa molecular de 145,25 g/mol [45]. A Put é o precursor das poliaminas Spd e Spm (Figura 7) [26, 46]. Estas poliaminas são essenciais no crescimento, diferenciação e apoptose celular e ainda apresentam funções anti-inflamatórias e antioxidantes [42, 47].

Ao longo do processo de envelhecimento verifica-se um decréscimo dos níveis intracelulares da Spd em vários órgãos, concretamente, nos ovários, nos pulmões, no

fígado, nos músculos, entre outros [47]. Porém, em pacientes com doença de Alzheimer os níveis encontram-se elevados [7, 47].

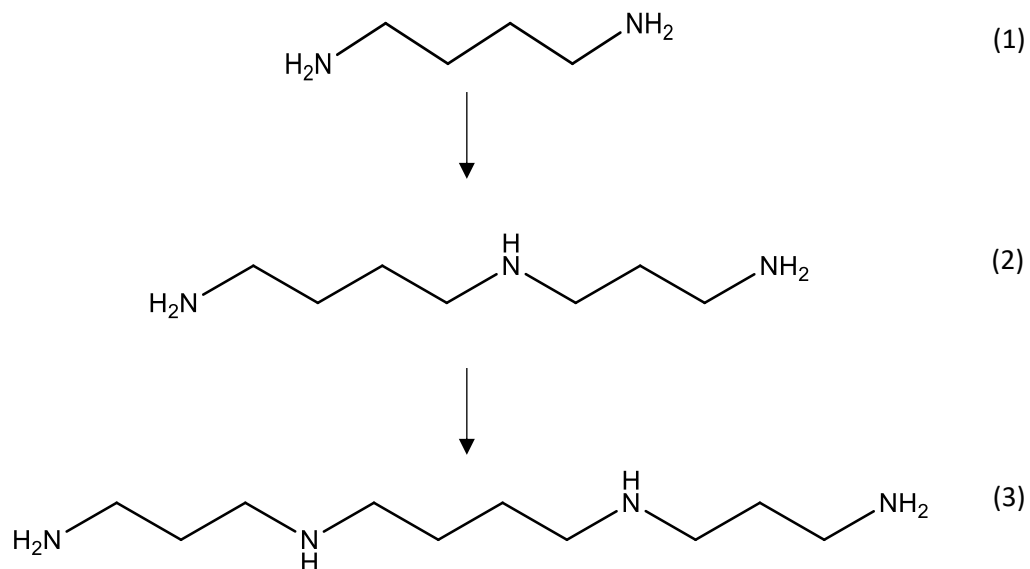


Figura 7. Formação da Spd (2) e da Spm (3) a partir da Put (1).

A Tir é uma monoamina resultante da descarboxilação da tirosina (Figura 8) [7, 36]. Possui fórmula molecular $C_8H_{11}NO$ que corresponde a uma massa molar de 137,18 g/mol [3].

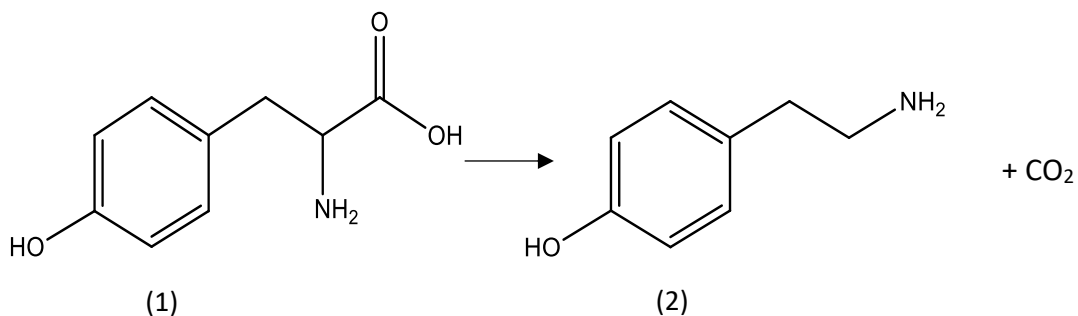


Figura 8. Formação da Tir (2) através da descarboxilação da tirosina (1).

A Tir tem como função a libertação de catecolaminas, as quais originam o aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca, podendo ter consequências graves, mais precisamente, dar origem a crises hipertensivas [30]. A Tir atua só, ou na presença de feniletilamina, provocando dores de cabeça devido às suas propriedades vasoconstritoras [48].

No peixe fresco, esta amina existe em quantidades baixas ou nulas. Contudo, um mau manuseamento induz um aumento dos seus níveis e atua como potenciador da formação da His [34].

Nos queijos envelhecidos existem abundantes quantidades de Tir. O consumo excessivo de queijo com elevados valores de Tir provoca a denominada reação do queijo, caracterizada pelo aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca, que poderá estar na origem de crises hipertensivas [30].

A Tri ($C_{10}H_{12}N_2$, 160,22 g/mol) é formada por descarboxilação do triptofano (Figura 9) [26].

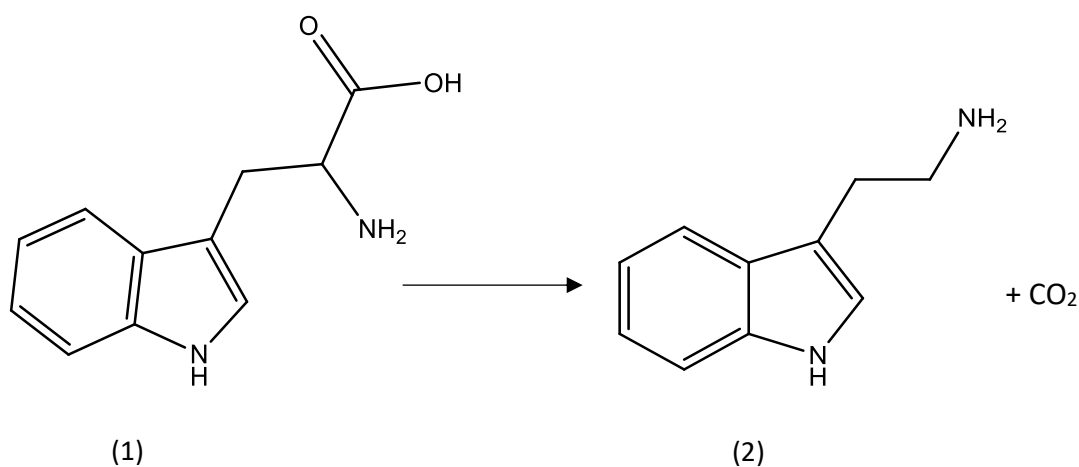


Figura 9. Formação da Tri (2) através da descarboxilação do triptofano (1).

A Tri é encontrada em plantas, fungos e animais. Esta apresenta funções neuromoduladoras, neurotransmissores e vasoconstritoras. Os seus derivados apresentam diversas propriedades: antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas e antidepressivas [49].

1.2.3 Importância dos Microrganismos na formação das Aminas Biogénicas

A presença de ABs nos alimentos em teores elevados é indicadora da deterioração dos alimentos e nesse sentido é de todo importante a monitorização dos níveis de ABs, os quais podem ser usados como marcadores dos níveis de contaminações [26].

Exemplos de microrganismos que possuem um sistema de descarboxilação de aminoácidos e que produzem ABs são fundamentalmente as seguintes espécies: *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* [3, 6].

Geralmente, no queijo são encontradas as espécies *Lactobacillus* que são responsáveis pela formação da His, Tir e Put [3, 26]. No peixe as espécies de microrganismos mais importantes são: *Morganella morganii* e *Klebsiella pneumoniae*, já que são capazes de produzir His [2]. De referir ainda que, as *Enterobacteriaceae* possuem a capacidade de acumular Cad e Put [6].

1.2.3.1 *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* pertence ao grupo das bactérias gram-negativas, não formadoras de esporos, que têm um tamanho compreendido entre 1-5 µm, sendo consideradas anaeróbicas facultativas e conseguem reduzir o nitrato a nitrito. O seu crescimento e atividade metabólica originam a formação de odores, mudança da cor e outras alterações nas características organoléticas dos alimentos, o que por sua vez afeta a qualidade dos alimentos, podendo potenciar a sua deterioração. Alguns dos alimentos nos quais a presença de *Enterobacteriaceae* é um problema bastante recorrente, são: leite, carnes, mariscos, frutas e vegetais [50].

A deterioração dos alimentos por microrganismos sofre influência dos fatores ambientais, nomeadamente, a temperatura, o pH e a A_w [18]. Quanto à temperatura

ótima de crescimento, as *Enterobacteriaceae* podem ser categorizadas em três grupos, as psicotrópicas, que possuem uma temperatura ótima de crescimento entre os 22-30 °C e que têm a capacidade de crescer abaixo dos 0 °C; as mesófilas, que conseguem proliferar em temperaturas entre 15-40 °C; e as termotolerantes, as quais necessitam de uma temperatura mínima de crescimento superior aos 7-8 °C, mas que têm a capacidade de resistir a temperaturas superiores aos 44 °C. Assim, quando se procede ao congelamento dos alimentos o uso de temperaturas abaixo dos -8 °C inibe o crescimento das *Enterobacteriaceae*, sendo que longos períodos de congelamento originam a sua inativação devido aos danos provocados. Contudo, durante o processamento dos alimentos não é aconselhável congelar por longos períodos, pois mesmo em condições adversas, algumas bactérias entram em estado de latência, podendo assim, sobreviver a condições extremas de temperatura [50].

A A_w propicia o desenvolvimento de *Enterobacteriaceae* para valores mínimos de 0,95. Dado que os alimentos frescos como o peixe, as carnes e as frutas, possuem valores de A_w de 0,98, favorecem o crescimento de microrganismos que estão associados a problemas de segurança alimentar [50].

O pH favorável ao crescimento das *Enterobacteriaceae* situa-se entre 4-9, sendo a deterioração alimentar favorecida quando o pH se encontra ligeiramente ácido ao neutro. A fim de evitar contaminações por microrganismos, os alimentos são aditivados, recorrendo para o efeito à adição de ácidos fracos - ácido acético, láctico, cítrico, ou através de processos de fermentação. Neste último, a adição de bactérias específicas inibe o crescimento dos microrganismos e origina sucessivamente a sua inativação através da produção de ácidos [50].

1.2.4 Importância da presença das Aminas Biogénicas nos alimentos

As ABs, presentes na nossa alimentação, principalmente nos alimentos fermentados, como é o caso de queijos, vinhos, cerveja e ainda em alimentos não fermentados, como frutas, chocolates e alguns produtos de pesca, são considerados importantes microcomponentes [26, 32].

As ABs interagem com o funcionamento normal do metabolismo humano, sendo necessário verificar a presença das mesmas nos alimentos devido aos potenciais efeitos tóxicos que podem originar [27]. Nesse sentido, os efeitos tóxicos despontaram a necessidade de um maior controlo das quantidades de ABs presentes nos alimentos [7].

A determinação quantitativa não só é importante devido à toxicidade originada pelas ABs, mas também pelo fato de poderem ser utilizadas como indicadores da qualidade alimentar, pois as suas concentrações estão relacionadas com as condições de higiene durante o processamento das matérias-primas, fornecendo informação útil sobre as condições a que os alimentos estiveram expostos, indicadora de serem ou não frescos [7, 25].

1.2.4.1 Limites para a concentração de Aminoácidos Biogénicos nos alimentos

O decréscimo gradual da qualidade do peixe após a sua captura proporciona o aparecimento de odores e sabores indesejados por consequência de reações enzimáticas e bacterianas [2]. De modo a garantir a segurança dos consumidores foram estabelecidos limites máximos para a concentração de ABs no peixe e em produtos de pesca [51]. Para garantir a segurança alimentar a FDA recomenda que os níveis de His presentes no peixe estejam de acordo com a Tabela 2 [3, 52].

Tabela 2. Níveis de His presentes no pescado e as suas consequências na saúde humana. Adaptado de Cardozo *et al.* [3].

Níveis de His (mg/kg)	Níveis de segurança no consumo humano
<50	Seguro
50-200	Possível tóxico
200-1000	Provavelmente tóxico
>1000	Tóxico e impróprio

Os níveis de Tir presentes nos alimentos são considerados toleráveis até 100 mg/kg [53, 54]. Níveis totais de ABs presentes nos alimentos, superiores a 1000 mg/kg, constituem um perigo para a saúde humana [53, 54]. O *Codex Alimentarius Commission* (CAC) estipulou que, nos escombrídeos, os níveis de His não podem ultrapassar os 200 mg/kg [52, 55, 56].

Assim, o estabelecimento de limites legais para o teor de ABs presentes nos alimentos constitui uma garantia de qualidade e de segurança alimentar [2].

1.2.4.2 As Aminas Biogénicas como indicadores da qualidade alimentar

De modo a avaliar a qualidade alimentar, Mietz e Karmas [57] verificaram que, em condições seguras de consumo, os valores de His, Put e Cad em amostras de atum enlatado são baixos, sendo que, à medida que as amostras se deterioram, aqueles têm tendência a aumentar. Por outro lado, os valores de Spd e Spm são elevados em amostras de atum frescas, diminuindo ao longo da deterioração.

A partir desta observação implementaram o índice de qualidade (IQ), baseando-se na concentração das ABs em mg/kg, de acordo com a Equação 1 [25, 55, 57, 58].

$$\text{Índice de qualidade} = \frac{[\text{histamina}] + [\text{putrescina}] + [\text{cadaverina}]}{1 + [\text{espermidina}] + [\text{espermina}]} \quad (\text{Equação 1})$$

Desta forma, os elevados níveis de Spd e Spm conjugados com os baixos valores de Put, Cad e His são indicadores de boa qualidade alimentar. Em contrapartida, a situação inversa indica a decomposição alimentar [57]. Assim, valores de IQ inferiores a 1 indicam boa qualidade alimentar, sendo os alimentos seguros para o consumo humano. Ao contrário, à medida que os valores do IQ aumentam, as características sensoriais dos alimentos diminuem. Valores de IQ entre 1 e 10 indicam baixa qualidade do alimento, enquanto valores acima de 10 indicam a degradação do alimento, não

sendo recomendável o seu consumo. Estes valores estão representados na Tabela 3 [58].

Tabela 3. Classificação de segurança alimentar segundo o IQ. Adaptado de Veciana-Nogués [58].

Classe	Escala	Qualidade alimentar
1	0-1	Boa qualidade
2	1-10	Baixa qualidade
3	>10	Decomposição alimentar

1.2.5 Dualidade dos efeitos das Aminas Biogénicas no homem

As aminas são compostos formados e destruídos através do metabolismo celular [7, 26]. A presença das mesmas em baixas concentrações é essencial, pois estão envolvidas no funcionamento vital das células e em vários processos fisiológicos, nomeadamente, na estabilização da membrana celular, na síntese proteica, na sinalização, na proliferação e no crescimento celular e ainda na cicatrização de feridas [7, 26, 32].

A Put está envolvida no crescimento celular e a His, a serotonina (Ser) e a Tir estão relacionadas com o sistema nervoso [59]. Na regulação do crescimento estão envolvidas a Spd, Spm e Cad; na transmissão neuronal a dopamina e a Ser; na mediação dos processos inflamatórios a His e a Tir. Ainda são mediadores hormonais a Tir e His, e possuem ação vasoconstritora a Tir e Tri, ao contrário da His e da Ser, que possuem uma ação vasodilatadora [26].

A Tri atua como vasoconstritora, induzindo assim ao aumento da pressão sanguínea, e conseqüente hipertensão arterial [26, 49]. É também considerada um neurotransmissor, pois regula o SNC e intervém no ciclo do sono, no humor, na ansiedade, na temperatura corporal, entre outros. Devido à capacidade de atenuar ou amplificar a informação transmitida pela Ser, a Tri possui função neuromoduladora.

Assim, às alterações da síntese ou do metabolismo da Tri estão associadas doenças como a esquizofrenia, Parkinson e a depressão [49].

As poliaminas (Put, Spd e Spm) participam na síntese do ADN, ARN e proteica, sendo essenciais na proliferação celular de vários tecidos [42]. Em períodos de crescimento celular intensivo, por exemplo, na recuperação pós-operatório, a ingestão de poliaminas é benéfica. Contudo, em alguns casos patológicos (tumores) o consumo de poliaminas deve ser minimizado [26].

O excesso de ABs é degradado nos seus produtos inativos através de aminoxidases, as quais, dependendo do número de grupos amina oxidados, são classificadas por monoamina oxidases (MAO) ou diamina oxidases (DAO). A capacidade de desintoxicação depende de cada indivíduo, podendo ser influenciada por fatores genéticos ou problemas de saúde [3]. Pessoas sensíveis, com insuficiência da DAO, sofrem reações indesejadas após a ingestão de alimentos com níveis significativos de His [8]. A intoxicação alimentar pode ser potenciada por outros fatores como drogas, álcool, doenças gastrointestinais e outras aminas presentes nos alimentos [26, 48]. Os fumadores também têm uma redução das MAO até 30%. A ingestão de antidepressivos, agentes parkinsónicos e medicamentos para a malária, entre outros, levam à redução das MAO e das DAO, possibilitando uma maior suscetibilidade de crises alérgicas [3]. Assim, a ingestão de alimentos com teores elevados de ABs diminui a capacidade de desintoxicação do organismo com o conseqüente aumento de riscos para a saúde humana [26].

Espécies como o atum e a cavala apresentam uma quantidade mais elevada de ABs, o que faz com que a formação de nitrosaminas seja também mais elevada nestas espécies. Alguns dos fatores que influenciam o aparecimento de nitrosaminas são a presença de nitritos e nitratos, o cloreto de sódio e a temperatura [25].

Os sais nitritos podem ser provenientes de bactérias redutoras ou do cloreto de sódio. O uso do sal impuro, para conservar os alimentos pode conter níveis elevados de nitritos (0,1-0,5 mg/kg) e nitratos (28-249 mg/kg) [25]. A presença de espécies redutoras de nitrato, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris*, são responsáveis pela redução do nitrato em más

condições de higiene. Apesar do cloreto de sódio inibir a formação de microrganismos, algumas espécies, como *E. coli*, não são totalmente inibidas e conseguem sobreviver em concentrações elevadas. A alteração das condições iónicas facilita as reações entre o nitrito e as aminas, conduzido assim à formação de nitrosaminas que apresentam um potencial carcinogénico [25].

Relativamente à temperatura verifica-se a formação de nitrosaminas quando os alimentos são submetidos a tratamentos térmicos [3]. Deste modo, as elevadas temperaturas induzem a reação entre as ABs e os nitritos resultando na formação de nitrosaminas. Esta reação pode também ocorrer a baixas temperaturas, no entanto, a cinética da reação é mais lenta [25].

1.3 Metodologia para a quantificação das Aminas Biogénicas

Para a determinação das ABs é necessário proceder à sua extração, purificação e respetiva análise. Usualmente, para analisar as ABs, recorre-se a técnicas cromatográficas [30]. No sistema cromatográfico o detetor é o principal componente que consegue converter um sinal químico e/ou físico num sinal mensurável que corresponde à sua concentração [8]. A determinação das ABs pode ser realizada por várias técnicas cromatográficas, nomeadamente, cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia de permuta iónica (IC), cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (HPLC) [25, 32].

A HPLC é a técnica mais frequentemente usada para a determinação das ABs, devido à sua elevada sensibilidade, resolução e versatilidade [11, 60]. Porém, tem como requisito a utilização dos agentes derivatizantes, sendo que através da derivatização é possível a deteção das aminas dansiladas por FLR [11, 30]. Contudo, os tempos de análise podem ser longos, podendo atingir tempos superiores 60 min [30].

Para diminuir os tempos de análise pode-se recorrer a uma nova geração de técnicas de separação, a UHPLC, que diminui drasticamente os tempos de corrida e aumenta a sua sensibilidade e resolução. É também possível analisar mais amostras em

menores períodos de tempo e com menores quantidades de solvente, respeitando os critérios propostos para a sustentabilidade ambiental [30, 36].

Existem ainda *kits* para a deteção e quantificação, por exemplo, da His. Estes *kits* consistem em testes ELISA, que são comercializados por diversas empresas e podem ser aplicados em diferentes produtos alimentares, como é o caso do peixe fresco, das salsichas, dos queijos e do leite. Com estes *kits*, consegue obter-se resultados em cerca de 60 minutos e não existem reações cruzadas com outras aminas, conseguindo detetar-se conteúdos de His abaixo de 50 mg/kg [5, 36, 61].

Deste modo é possível realizar o controlo de qualidade alimentar nas várias fases do processamento alimentar [8].

1.3.1 Técnicas extrativas

Dada a complexidade das matrizes a determinação analítica não é simples. Digamos que a extração das aminas das matrizes, cuja finalidade é obter resultados fiáveis e adequados, é algo um tanto ao quanto crítico. São usadas diferentes técnicas extrativas variadas como, a extração líquido-líquido (LLE), a extração sólido-líquido (SLE), a extração em fase sólida (SPE) e a microextração em fase sólida (SPME), entre outros [8]. A extração das ABs de matrizes é assistida pelo uso de ácidos, normalmente, o ácido clorídrico (HCl) e o ácido perclórico (HClO₄). Todavia, solventes orgânicos como o metanol (MeOH), a acetona (ACE) e o acetonitrilo (ACN) também podem ser usados. A escolha do solvente vai depender dos analitos a analisar. A derivatização obriga à otimização de diferentes parâmetros, entre os quais o pH. A Tir por exemplo é extraída com elevada eficiência para valores de pH próximos de 10, no entanto, esta condição não é benéfica para a extração da Put, Cad, Spd, Spm e His [8].

O QuEChERS é um acrónimo identificativo de rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro [62, 63]. Com o decorrer dos anos foram realizadas melhorias e adaptações a esta técnica, sendo esta a predileta para análises com matrizes alimentares, como frutas, verduras, vinhos, cereais, alimentos enlatados e produtos de origem animal (carne, peixe, marisco, entre outros) [64]. O QuEChERS é composto por

três etapas, sendo a primeira referente à extração dos compostos de interesse, a segunda à remoção de interferentes através do uso do *Clean-up*. Esta etapa é seguida de injeção dos extratos e análise cromatográfica para a identificação e quantificação dos analitos [62]. Assim, na fase de extração é importante selecionar o solvente a usar, de modo a maximizar a eficiência de extração. O ACN é um dos solventes orgânicos mais usados no QuEChERS pois fornece as melhores condições de extração com um número reduzido de co-extratos e é compatível com as análises em GC e HPLC. O uso de sais como o sulfato de magnésio anidro melhora a recuperação de analitos polares e facilita a partição. O uso do cloreto de sódio reduz a quantidade de interferências polares e facilita o “salting-out” e, ainda, as soluções tampão mantêm as condições de pH favoráveis [62].

É igualmente importante o recurso ao *clean-up*, de modo a reduzir as interferências existentes na matriz [62, 63]. A utilização do sorvente octadecil (C18) auxilia a remoção de esteróis, interferentes não polares e compostos de cadeia longa. O sulfato de magnésio anidro é utilizado para remover excesso de água presente na fase orgânica e a utilização do sorvente amina primária secundária (PSA) para a remoção de açúcares, ácidos orgânicos, lípidos e alguns pigmentos [62].

A Microextração Assistida por Ultrassons (USAMET) foi desenvolvida, pela primeira vez, através da adaptação da técnica extrativa QuEChERS. A USAMET permite a extração das ABs em amostras de atum, utilizando pequenas quantidades de amostra (1 g), baixos volumes de solvente (1 mL) e reduzido tempo de agitação com recurso ao US (5 min). Ao contrário do QuEChERS, a técnica extrativa utilizada não requer a utilização de *clean-up* após a etapa de extração dos compostos de interesse, apenas é utilizada a centrifugação (4000 rpm, 5 min) para separar as fases.

1.3.2 Agentes derivatizantes

Devido à fraca sensibilidade que as ABs apresentam na gama UV-Vis é necessário a realização de uma etapa de derivatização de modo a obtermos derivados que

potenciem o sinal analítico e desta forma possibilitem a deteção de ABs mesmo em quantidades vestigiais. [8].

Para a derivatização das ABs são usados diversos agentes químicos, nomeadamente o DnsCl, o cloreto de benzoílo (BzCl), o O-ftalaldeído (OPA), a fluoresceína, entre outros [8, 32]. Os derivados fluorescentes do OPA têm um tempo de vida curto, pelo que é preferível o uso do DnsCl e do BzCl, devido à afinidade com as diaminas e as poliaminas, tornando os derivados mais estáveis [32]. Uma das vantagens da utilização do DnsCl prende-se com o facto de conseguir não só ligar-se a aminas primárias, mas também, a aminas secundárias e, ainda, a aminas terciárias, permanecendo os derivados estáveis durante o tempo suficiente para a análise [6, 65]. Na Figura 10 está exemplificada a reação de derivatização do DnsCl com uma amina. De referir também que o BzCl reage com aminas primárias e secundárias, formando compostos estáveis [32].

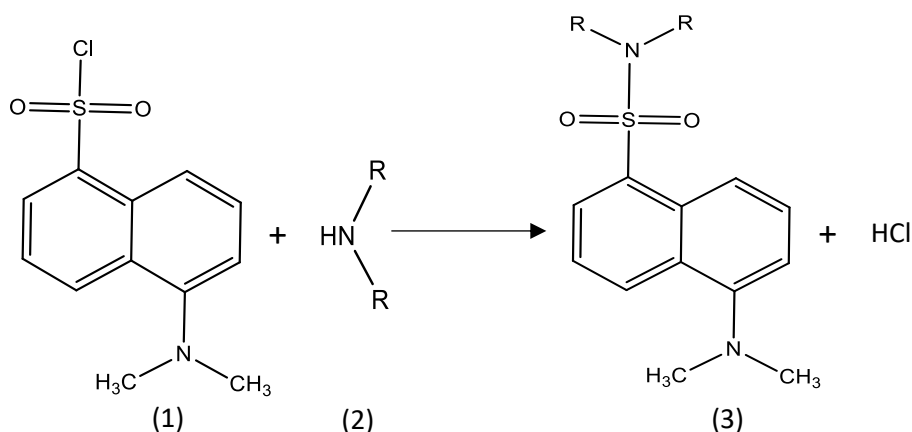


Figura 10. Reação de derivatização do DnsCl (1) com uma amina terciária (2) originando uma amina dansilada (3).

CAPÍTULO II

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2 Materiais e métodos

No presente capítulo será abordado todo o procedimento experimental realizado na elaboração deste trabalho. Recorreu-se à USAMET para extrair as ABs das diferentes amostras de atum, seguida da derivatização dos extratos com DnsCl e posterior análise por UHPLC-FLR.

2.1 Reagentes químicos e materiais

Com vista à elaboração do trabalho prático foram adquiridos os seguintes padrões: cadaverina (Cad, 1,5-diaminopentano, 98%, acros organics), espermina (Spm, 97%, acros organics), espermidina (Spd, 99%, acros organics), histamina (His, 2- (4-imidazol), putrescina (Put, 1,4-diaminobutano, 99% acros organics), tiramina (Tir, 4- (2-aminoetil), triptamina (Tri, 98%, alfa aesar) e 1,7-diaminoheptano (padrão interno, 98% acros organics).

Nas diferentes etapas do trabalho foram usados os seguintes reagentes: ácido orto-fosfórico (H_3PO_4 , 85%, AnalaR), ácido fórmico (HCOOH , 98%, Panreac), sódio tetraborato-10-hidrato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 99,5%, Riedel-de Haën), cloreto de dansilo (DnsCl, 99%, Sigma-Aldrich), hidróxido de sódio (NaOH , 98%, Panreac), cloreto de sódio (NaCl , 99,5%, Panreac), sulfato de magnésio anidro (MgSO_4 , 96%, Panreac), citrato trissódico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NaO}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99%, Sigma-Aldrich), acetato de sódio trihidratado ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 99%, Panreac), hidrogenocitrato de sódio sesqui-hidrato ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$, 99%, Aldrich).

Usou-se ainda os seguintes solventes: Acetona (ACE, grau HPLC, Fisher chemical), Acetonitrilo (ACN, grau HPLC, Fisher chemical), Metanol (MeOH, grau HPLC, Fisher chemical).

Relativamente aos equipamentos recorreu-se ao uso de ultrassons (Branson 2510), balança analítica (Pioneer), medidor de pH (Mettler Toledo), vórtex (Thermolyne) e UHPLC-FLR (Waters).

Quanto aos materiais foram usadas micropipetas (Orange scientific), eppendorfs (2 mL, Frilabo), seringas (2 mL, Ecoject), filtros de seringa (13 mm, hidrofílico, PTFE, 0,22 μ m), papel de pH, tubos de centrífuga graduados (15 mL, Labbox), Micro-insert (0,1 mL, VWR) e gobelets.

2.2 Preparação das soluções

Procedeu-se à preparação das soluções stock da Cad, Spm, Spd, His, Put e Tir, em água ultrapura acidificada (0,1% ácido fórmico) com concentrações de 2 e 25 g/L, respetivamente. Idêntico procedimento foi adotado para a Tri, mas usando como solvente a ACE.

Como padrão interno (PI) foi usado o 1,7-diaminoheptano na concentração de 2 g/L, preparado em água ultrapura acidificada (0,1% ácido fórmico). Preparou-se ainda o agente derivatizante cloreto de dansilo (DnsCl) em ACE na concentração de 50 g/L.

A solução tampão de tetraborato de sódio, com a concentração de 38,1 g/L, foi preparada em água ultrapura e acertou-se o pH da solução a 10,5, com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 12 M.

2.3 Preparação das amostras

Para a realização do presente trabalho prático adquiriu-se uma posta de atum fresca (0,500 kg) no supermercado “Continente”. O *Thunnus Obesus* foi capturado no mar Atlântico Centro Este, recorrendo para o efeito ao uso de aparelhos de anzol.

No laboratório separou-se as diferentes partes da posta, concretamente, o músculo branco, o músculo vermelho, a espinha e a pele (Figura 11), tendo sido analisados, apenas, os músculos branco e vermelho.

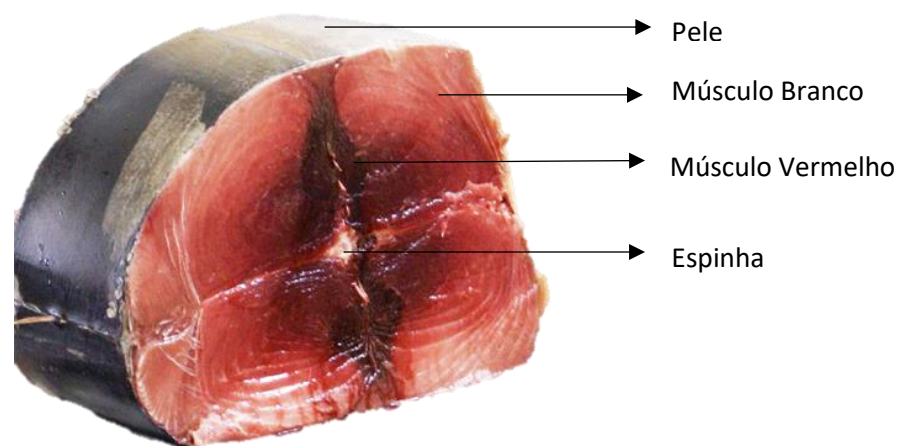


Figura 11. Representação da constituição de uma posta de atum.

Em seguida, com o auxílio de uma varinha mágica, moeu-se o músculo branco do atum, obtendo-se uma pasta homogênea, a qual foi alíquotada em frações de 25 g, tendo sido armazenadas à temperatura de -20 °C. Igual procedimento foi adotado para o músculo vermelho.

Adquiriu-se ainda bife do lombo de atum ultracongelado, pertencente à espécie *Thunnus Obesus*, proveniente do Oceano Pacífico. Já no laboratório procedeu-se em conformidade com o anteriormente descrito relativamente à posta fresca, sendo o bife homogeneizado e posteriormente armazenado.

Foram ainda adquiridos derivados de atum em superfícies comerciais, nomeadamente, atum enlatado em óleo, em azeite e ao natural e também paté de atum, tudo da marca “Continente”.

2.4 Procedimento extrativo

Através de modificações do QuEChERS original, desenvolvido por *Annastasiades et al.* [66], desenvolveu-se o USAMET. Neste método extrativo, para cada uma das 48 condições extrativas referidas na Tabela 4, pesou-se 1 g de amostra num tubo de centrífuga ao qual foram adicionados 5 µL do PI (1,7-diaminoheptano [2 g/L]) e 1000 µL

de solvente, homogeneizou-se a solução e colocou-se sob agitação por US de acordo com a condição selecionada e posteriormente centrifugou-se a 4000 rpm, durante 5 min.

Tabela 4. Condições utilizadas para a otimização do processo extrativo das ABs.

Sais e tampões	Agitação	Solventes
S/ tampão S/sais	1 min (Manual)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
	1 min (US)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
	5 min (US)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
	10 min (US)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
S/ tampão Sais: Cloreto de sódio (0,0313 g) Sulfato de magnésio (0,1250 g)	1 min (Manual)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
	1 min (US)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
	5 min (US)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
	10 min (US)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
Tampão: Citrato (0,0313 g) Hidrogenocitrato (0,0156 g)	1 min (Manual)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
	1 min (US)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)

Sais: Cloreto de sódio (0,0313 g) Sulfato de magnésio (0,1250 g)	5 min (US)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
	10 min (US)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
	1 min (Manual)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
Tampão: Acetato de sódio (0,0469 g)	1 min (US)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
Sais: Cloreto de sódio (0,0313 g) Sulfato de magnésio (0,1250 g)	5 min (US)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)
	10 min (US)	ACN
		MeOH
		ACN:MeOH (1:1)

2.5 Derivatização com DnsCl

Determinou-se as melhores condições de derivatização com DnsCl utilizando-se uma metodologia multifatorial. Combinou-se diferentes concentrações de DnsCl, com diferentes tempos de US e diferentes temperaturas, de acordo com o descrito na Tabela 5.

Após a etapa de extração, retirou-se 500 µL do sobrenadante e adicionou-se 290 µL de ACE, 50 µL de água ultrapura e 100 µL de tampão tetraborato e aplicou-se cada uma das condições apresentadas na Tabela 5. Em seguida filtrou-se o extrato, mediu-se o pH e, por fim, diluiu-se na porção de 1:2 em água acidificada (0,1% ácido fórmico).

Tabela 5. Parâmetros usados para a otimização das condições de derivatização com o DnsCl.

DnsCl (g/L)	Agitação (min)	Temperatura (°C)
1,0	10 (s/US)	23
		40
		60
	10 (US)	23
		40
		60
	20 (US)	23
		40
		60
2,0	10 (s/US)	23
		40
		60
	10 (US)	23
		40
		60
	20 (US)	23
		40
		60
3,0	10 (s/US)	23
		40
		60
	10 (US)	23
		40
		60
	20 (US)	23
		40
		60

2.6 Condições cromatográficas

Selecionou-se um equipamento de cromatografia líquida de ultra-pressão (UHPLC), (*Waters, Mildford, MA, EUA*) o qual é constituído por um sistema de bombas

quaternário (QSM), amostrador automático, um forno de colunas e ainda um detetor de FLR. Possui ainda um *software (Empower)*, responsável pelo funcionamento do equipamento.

A resolução na separação cromatográfica foi avaliada com 2 colunas: a Acquity UPLC BEH C18 (2,1 mm×50 mm, partículas de 1,7 µm de diâmetro) e a Acquity UPLC CSH C18 (2,1 mm× 150mm, partículas de 1,7 µm de diâmetro). Para eluição dos compostos usou-se um gradiente trifásico constituído pelos solventes ACN, MeOH e ácido fosfórico 0,1%, os quais foram previamente filtrados com um filtro PTFE 0,22 µm. A análise foi realizada com um detetor de FLR, a um comprimento de excitação de 300 nm e de emissão de 500 nm, e ainda, um detetor de conjunto de fotodíodos (PDA), a um comprimento de onda de 250 nm.

2.7 Validação do método analítico

Para validar o método, avaliou-se a linearidade (através da determinação do coeficiente de correlação), a exatidão, a precisão, os limites de deteção (LOD), de quantificação (LOQ), e o efeito de matriz (EM).

A linearidade foi avaliada através da construção de curvas de calibração para cada uma das ABs com os seguintes valores de concentração (mg/kg): 0,05; 0,5; 5; 25; 125; 250; 375; 500 e 750. Cada solução foi injetada em triplicado. Usou-se o modelo de regressão linear $y=mx+b$, onde y corresponde à razão entre a área obtida pela área do padrão interno, e x corresponde à concentração. Os dados da curva de calibração foram usados para determinar o coeficiente de correlação (R^2) [67].

A exatidão corresponde ao grau de concordância entre os resultados obtidos pela metodologia analítica e o valor real existente na amostra [68]. Determinou-se o cálculo percentagem de recuperação através da expressão: Percentagem de recuperação (%) = $(C_{exp}/C_{teo}) \times 100$, onde C_{exp} corresponde à concentração experimental e C_{teo} corresponde a concentração teórica.

Determinou-se também o LOQ, correspondente à menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão, calculado pela seguinte expressão: $LOQ = b + 10 \times (\sigma/m)$, onde b corresponde à ordenada na origem, σ corresponde ao desvio padrão e m ao declive [68–70]. O LOD, que corresponde à menor concentração detetável, acima do ruído de fundo do sistema, representada através da seguinte expressão: $LOD = b + 3.3 \times (\sigma/m)$, onde b corresponde à ordenada na origem, σ corresponde ao desvio padrão e m ao declive [68–70].

Para a determinação da precisão intradia (repetibilidade) realizaram-se extrações em triplicado, no mesmo dia, de amostra fortificada com diferentes níveis de concentração: nível mínimo (0,05 mg/kg), nível médio (375 mg/kg) e nível máximo (750 mg/kg). A reprodutibilidade (precisão interdia) foi determinada pela realização de extrações em triplicado em 3 dias diferentes, usando os níveis de concentração iguais aos da repetibilidade. A precisão é expressa pela percentagem do desvio padrão relativo (RSD%), determinada pela fórmula $RSD (\%) = (s/\bar{x}) \times 100$, onde o s corresponde à estimativa do desvio padrão absoluto e \bar{x} corresponde à média das medições [68].

O EM foi determinado através da seguinte expressão: $EM (\%) = (\text{declive da curva de calibração amostra} / \text{declive da curva de calibração padrão}) \times 100$. Os valores próximos de 100% indicam que o EM é mínimo, todavia, para valores inferiores a 80% e superiores a 120% indicam que a extração é influenciada pela natureza da amostra [71].

Procedeu-se, posteriormente, à análise estatística dos resultados obtidos, com recurso ao Microsoft Office e ao MiniTab 17.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 Resultados e discussão

Nesta etapa do trabalho serão apresentados, interpretados e discutidos os resultados obtidos na otimização, validação da metodologia analítica e respectiva aplicação.

3.1 Otimização das condições de derivatização com DnsCl

O processo de derivatização é importante para a detecção das ABs, uma vez que não são detetadas sem a presença de um grupo fluorescente. Foram utilizadas diferentes condições experimentais para a otimização do processo de derivatização. Na Figura 12 apresentam-se os resultados obtidos.

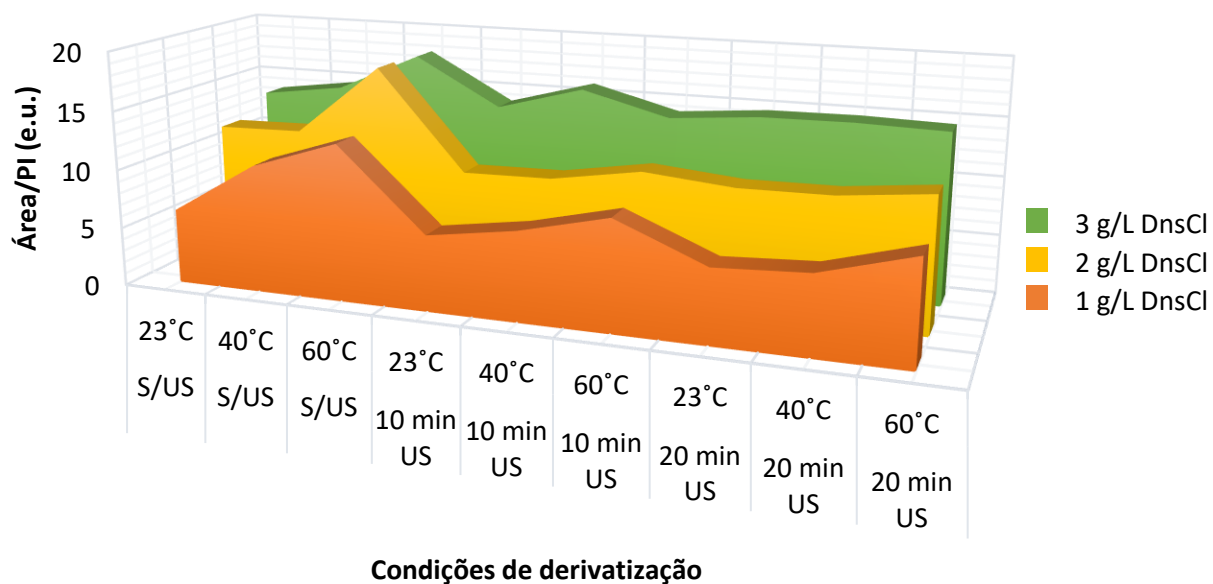


Figura 12. Influência da temperatura, concentração de DnsCl e tempo de US no processo de derivatização.

Verifica-se o aumento da concentração de DnsCl corresponde ao aumento das áreas das ABs em estudo. O processo de derivatização é também favorecido pelo

aumento da temperatura. Relativamente ao aumento de agitação por US verifica-se, uma diminuição da eficiência da derivatização expressa pela diminuição das áreas das ABs. Apesar dos resultados demonstrarem que a melhor temperatura para a derivatização das ABs é aos 60 °C, esta temperatura não pode ser utilizada, uma vez que a ACE, um dos constituintes da mistura reacional usada para a derivatização, tem um ponto de ebulição de 56 °C. Assim sendo, a mistura quando exposta a elevadas temperaturas, origina a evaporação da ACE com o correspondente aumento de concentração dos analitos, traduzido no aumento das áreas das ABs. Assim, as melhores condições experimentais para a derivatização das ABs são: concentração de 3 g/L de DnsCl, com um tempo de agitação por US de 10 min, à temperatura de 40 °C.

3.2 Otimização das condições extrativas por USAMET

No processo extrativo sem a utilização dos sais e do tampão, usaram-se diferentes tempos de agitação por US e diferentes solventes, na Figura 13 representa-se as condições usadas. Verifica-se que a melhor condição extrativa ocorre com cinco min de US e com o solvente ACN. Podemos ainda verificar que o uso do MeOH não favorece o processo extrativo, pois obtém-se valores de área muito inferiores aos observados com o ACN.

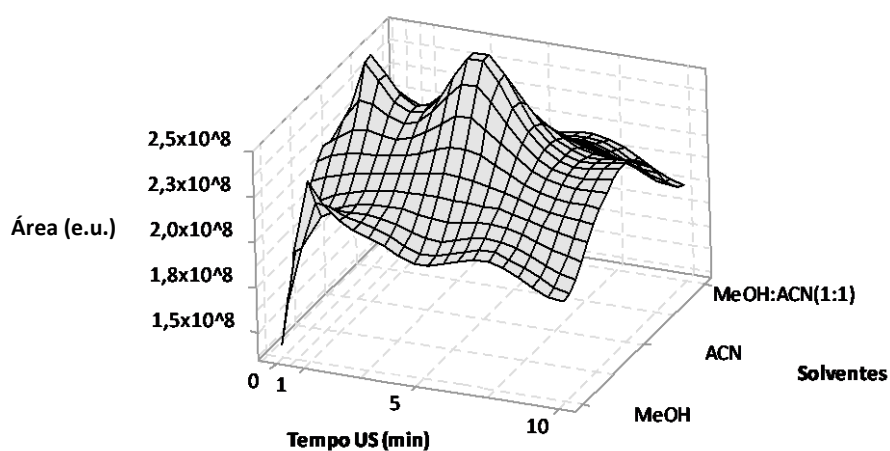


Figura 13. Representação das condições utilizadas no processo extrativo, sem a utilização de sais e sem tampão.

Através da utilização dos sais (NaCl e MgSO₄) e sem a adição do tampão, testaram-se diferentes tempos de agitação por US e diferentes solventes, na Figura 14 estão representadas as condições usadas no processo extrativo.

Observa-se que a melhor condição obtida foi com um minuto de US e com o solvente de MeOH:ACN (1:1). Em contrapartida o solvente ACN origina a pior resposta com todos os tempos de US.

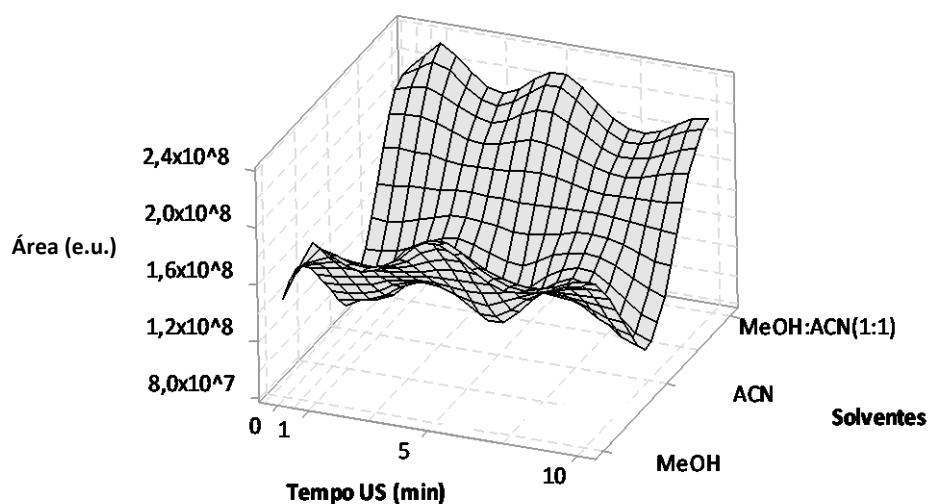


Figura 14. Representação das condições utilizadas no processo extrativo com a utilização de sais (NaCl e MgSO₄) e sem tampão.

Na Figura 15 estão representadas as condições usadas no processo extrativo, nomeadamente os tempos de agitação por US e os diversos solventes, com o uso dos sais (NaCl e MgSO₄), combinados com o tampão (constituído por citrato e hidrogenocitrato).

Verifica-se que o melhor resultado é obtido sem recorrer ao uso do US, ou seja, procede-se a agitação manual por um minuto, com a mistura dos solventes MeOH:ACN (1:1). Em contrapartida, os resultados obtidos sem o uso de US e usando o ACN como solvente, não foram satisfatórios.

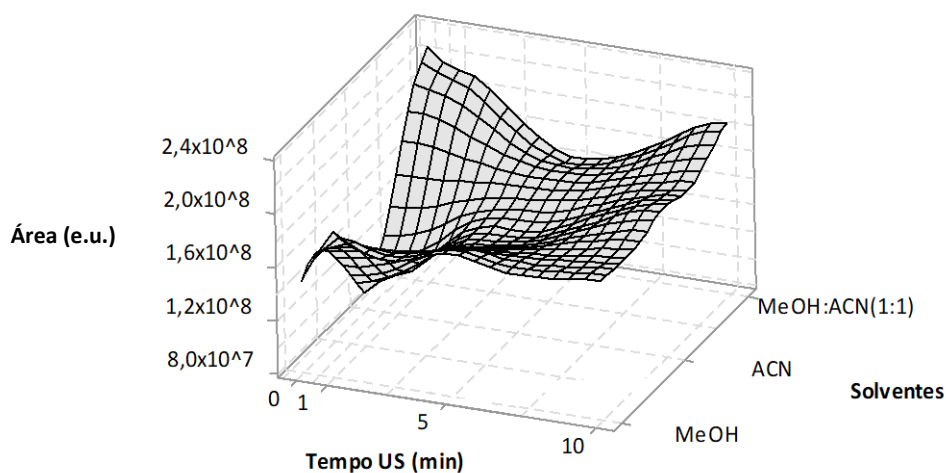


Figura 15. Representação das condições utilizadas no processo extrativo com a utilização de sais (NaCl e MgSO₄) e com tampão citrato.

Finalmente, na Figura 16 estão representadas as condições utilizadas no processo extrativo, nomeadamente os vários tempos de agitação por US e os diferentes solventes, com a utilização dos sais (NaCl e MgSO₄) e do tampão (constituído por acetato de sódio). Conclui-se que a melhor condição extrativa é com um minuto de US e com uma mistura de solventes de MeOH:ACN (1:1). De referir que o ACN foi o solvente que obteve os valores mais baixos para todos os tempos de US.

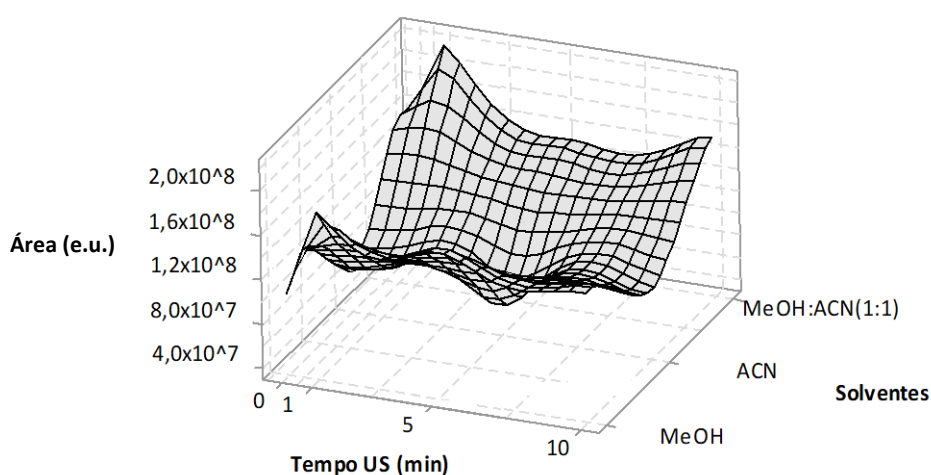


Figura 16. Representação das condições utilizadas no processo extrativo com a utilização de sais (NaCl e MgSO₄) e com tampão acetato.

Analisou-se as condições utilizadas no processo extrativo das ABs e verificou-se que a melhor condição extrativa não requer o uso dos sais e do tampão e utiliza um tempo de agitação assistida por US de cinco minutos com o solvente ACN.

3.3 Otimização das condições cromatográficas

Para maximizar a resolução cromatográfica é necessário otimizar as condições instrumentais nomeadamente a natureza, o fluxo da fase móvel, a coluna cromatográfica e o sistema de deteção.

3.3.1 Comparação da sensibilidade entre os detetores PDA vs. FLR para as Aminas Biogénicas

De modo a seleccionar o detetor que possui uma maior sensibilidade na deteção das ABs comparou-se o PDA e o FLR.

O detetor PDA determina a absorvência do composto através da quantidade de radiação que é absorvida pela amostra. Opera no intervalo entre os 190-400 nm [72–74]. O detetor FLR mede a emissão de luz por compostos previamente excitados a um nível de energia superior, possuindo maior sensibilidade e seletividade, quando comparados com os detetores UV. É, no entanto, necessário que os compostos emitam fluorescência. Caso tal não aconteça, deve proceder-se à sua derivatização. O detetor FLR permite ainda trabalhar de forma favorável com gradientes e em baixas concentrações de amostra [73, 75].

De modo a comparar a sensibilidade dos detetores de FLR e de PDA, realizou-se a separação e deteção cromatográfica dos analitos de interesse, nas mesmas condições. Através da comparação dos valores das áreas obtidas para cada uma das ABs para cada um dos detetores (Figura 17), foi possível concluir que o detetor de FLR possui maior sensibilidade que o detetor PDA, tendo sido o seleccionado para a deteção das ABs.

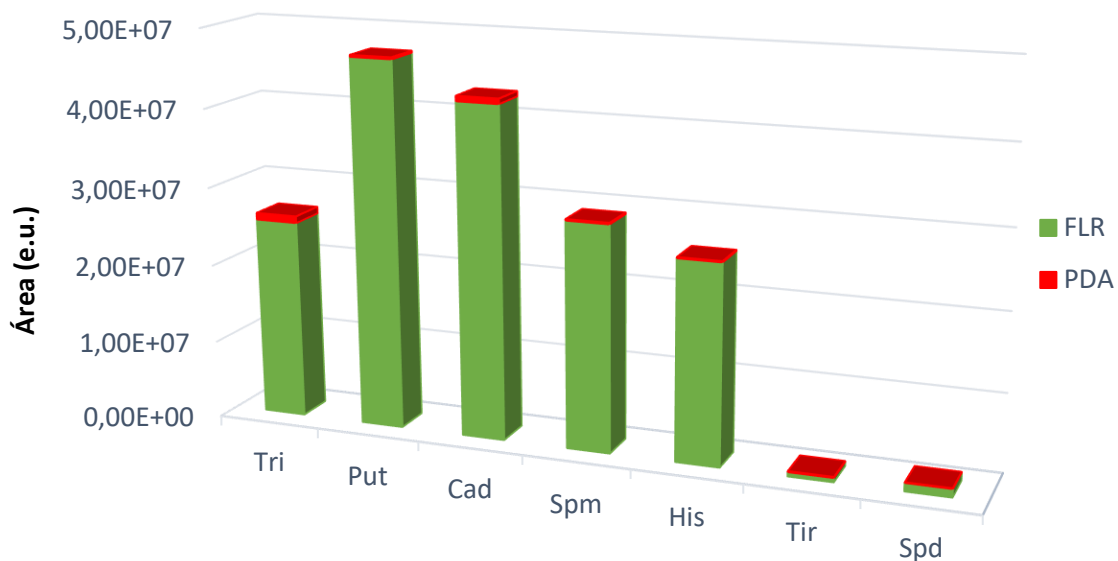


Figura 17. Comparação da sensibilidade dos detetores FLR ($\lambda_{exc}=300nm$ e $\lambda_{emi}=500nm$) e PDA ($\lambda_{abs}=250nm$) para detecção das ABs.

3.3.2 Comparação da performance das colunas Acquity UPLC BEH C18 e Acquity UPLC CSH C18

De modo a seleccionar a fase estacionária com melhor performance para a separação dos compostos compararam-se as colunas Acquity UPLC BEH C18 (2,1 mm×50 mm, partículas de 1,7 μm de diâmetro) e Acquity UPLC CSH C18 (2,1 mm× 150mm, partículas de 1,7 μm de diâmetro).

A fase estacionária da coluna CSH (Carga superfície incorporada) suporta uma gama de pH de 1-11, ideal para a separação dos analitos de interesse, sob o uso de fases móveis ácidas, com baixa força iónica, fornecendo picos com boa resolução [76, 77].

A coluna BEH (Etileno híbrido interconectado), devido igualmente à sua ampla gama de pH, 1-12, permite separar os analitos em estudo, que neste caso possuem valores elevados de pH. Possui uma boa estabilidade química em condições extremas de pH e elevadas temperaturas, sendo assim uma coluna universal, capaz de separar uma vasta variedade de compostos [77]. A fase estacionária mais adequada para a

separação das ABs foi a Acquity UPLC BEH C18, uma vez que conduz à obtenção de uma maior resolução cromatográfica, como é possível observar na Figura 1.A.

3.3.3 Seleção da fase móvel

De maneira a conseguir uma separação cromatográfica rápida e eficaz, isto é, com boa resolução, é necessário selecionar a fase móvel mais adequada. Os melhores resultados foram obtidos usando um gradiente trifásico (ácido fosfórico 0,1%; ACN e MeOH) com um fluxo de 0,200 mL/min, (Tabela 6). A temperatura da coluna foi de 40 °C e o volume de injeção de 2 µL. Com estas condições o tempo de análise cromatográfica das ABs foi de 15 min, com um acondicionamento de 2 min, usando o detetor FLR, com o λ_{exc} = 300 nm e um λ_{emi} = 500 nm.

Tabela 6. Composição do gradiente de separação cromatográfica com fluxo de 0,200mL/min.

Tempo (min)	Composição das fases móveis (% v/v)		
	Ácido fosfórico 0,1%	ACN	MeOH
0.00	65	-	35
0.50	60	-	40
0.75	40	-	60
5.00	30	-	70
8.00	30	70	-
8.50	20	80	-
9.00	10	90	-
9.50	50	50	-
15.00	65	-	35

Após a injeção do derivado, aplicando as condições anteriores (coluna BEH, gradiente trifásico e detetor FLR) foi possível obter uma boa separação das ABs, resultando o seguinte cromatograma (Figura 18).

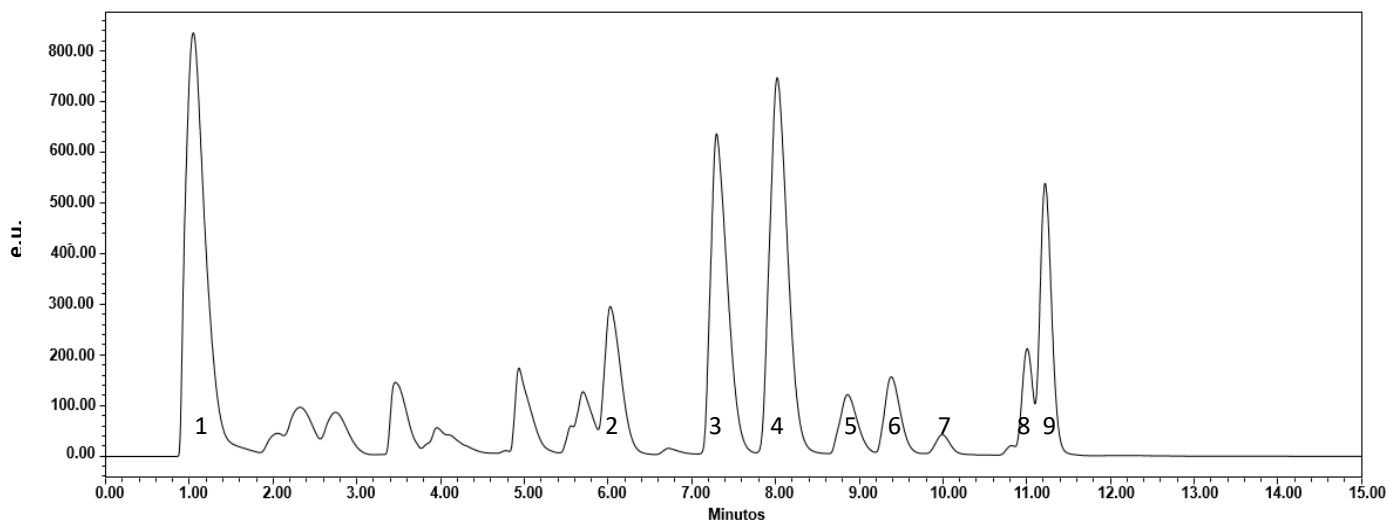


Figura 18. Cromatograma de uma solução padrão de ABs após derivatização (coluna BEH C18 com detecção por FLR). Legenda: 1-DnsCl; 2-Tri; 3-Put; 4-Cad; 5-Spm; 6-His; 7-Pl; 8-Tir; 9-Spd.

3.4 Validação da metodologia analítica para a determinação de Aminas Biogénicas no atum.

A validação tem como função suportar a confiabilidade dos resultados obtidos [68]. No presente trabalho procedeu-se à validação da metodologia USAMET/UHPLC-FLR, através de diversos parâmetros, como a seletividade, a linearidade, a exatidão, a precisão, o LOD, o LOQ e o EM.

A seletividade assume relevante destaque, dada a respetiva capacidade de identificar, de forma inequívoca, os vários analitos em matrizes complexas, sem interferência de outros compostos [68, 70, 78]. De modo a confirmar a presença das ABs fortificou-se a amostra de atum com as aminas de interesse (Figura 2.A) onde é possível verificar que o método possui seletividade.

A capacidade de obter resultados que são diretamente proporcionais a uma gama de concentrações conhecidas denomina-se linearidade [68, 79]. A linearidade foi

obtida através do método do padrão interno (PI - 1,7-diaminoheptano), a qual permite calcular a concentração de amina na amostra real [78].

A linearidade da resposta das ABs foi avaliada na gama de concentrações 5-750 mg/kg, sendo que a todas as concentrações foi adicionado o PI (2g/L). Para cada uma das ABs representou-se graficamente a relação entre a área relativa (área da amina/área do PI) e a concentração do analito. A linearidade da curva de calibração foi confirmada através do coeficiente de correlação (R^2), ou seja, a resposta tende para a linearidade, à medida que o coeficiente tende para 1 [70]. As curvas de calibração das ABs encontram-se representadas na Figura 3.A. De acordo com os resultados obtidos, representados na Tabela 7, pode considerar-se que o método é linear para as ABs em estudo, apresentando valores de $R^2 > 0,9809$. A partir da curva de calibração foi possível determinar o LOD e o LOQ (Tabela 7) recorrendo às fórmulas anteriormente descritas na metodologia, sendo expressos os resultados sob a forma de concentração (mg/kg). Assim, o LOD varia entre 0,98 mg/kg (Put) e 8,57 mg/kg (Tir) e o LOQ entre 3,20 mg/kg (Put) e 25,64 mg/kg (Tir).

Tabela 7. Resultados da validação do processo analítico, nomeadamente, tempos de retenção, gama de concentrações, linearidade, LOD e LOQ das ABs.

ABs	Tempo Retenção (min)	Gama de concentrações (mg/kg)	Equação da reta de calibração	R^2	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Tri	5,8	25-750	$y=0,0304x+0,00565$	0,9990	4,97	14,93
Put	7,1	5-750	$y=0,0302x-0,1091$	0,9967	0,98	3,20
Cad	8,0	25-750	$y=0,0487x+0,4876$	0,9809	5,24	14,89
Spm	8,9	25-750	$y=0,0003x-0,0025$	0,9929	7,39	22,39
His	9,2	25-750	$y=0,0023x-0,0441$	0,9887	2,71	8,31
Tir	10,8	125-750	$y=0,0064x+0,1556$	0,9877	8,57	25,64
Spd	11,2	25-750	$y=0,0037x-0,0456$	0,9938	6,59	20,07

Para avaliar a precisão da metodologia desenvolvida determinou-se a reprodutibilidade e repetibilidade do método. Estes são calculados através do RSD, podendo ser aceites valores até 20% [68]. Na Tabela 8 estão representados os resultados obtidos, sendo que nos três níveis de concentração, para a precisão intradia os valores variaram entre 5,24% (Spm) e 11,64% (His), enquanto que para a precisão interdia variaram entre 8,21% (Cad) e 14,20% (His). Os resultados obtidos encontram-se todos abaixo de 20% o que indica que o método possui uma precisão elevada. Na percentagem de recuperação das ABs (Tabela 8) obtiveram-se resultados satisfatórios a variarem entre 76-106%, demonstrando assim a eficiência do processo extrativo.

Determinou-se a influência da matriz na eficiência do processo extrativo. Os resultados estão representados na Tabela 8. Para que o EM não seja significativo, ou seja, para que a natureza da matriz não influencie a eficiência da extração, os valores têm de estar próximos de 100%. O facto de todos os valores do EM obtido para as ABs (Tabela 8) se encontrarem abaixo de 80% é indicador da influência da amostra no processo extrativo.

Tabela 8. Valores obtidos para a determinação da precisão, exatidão e EM do método USAMET.

ABs	Precisão (RSD %)		Exatidão (%)	EM (%)
	Intradia	Interdia		
	Tri	9,38		
Put	9,37	12,86	76-99	32,40
Cad	6,78	8,21	87-106	42,61
Spm	5,24	12,76	79-99	2,01
His	11,64	14,20	80-103	7,52
Tir	8,73	9,77	94-103	50,00
Spd	8,97	11,30	88-103	15,35

3.5 Aplicação da metodologia para a determinação de Aminas Biogénicas em diferentes amostras de atum

A metodologia validada foi aplicada em sete amostras de atum - atum fresco em posta, composto pelos músculos branco e vermelho, bife de atum congelado, composto pelo músculo branco, atum em conserva, nomeadamente, em paté, em azeite, em óleo e ao natural. Na Tabela 9 estão representadas as concentrações de ABs presentes nas amostras analisadas.

Tabela 9. Valores obtidos na determinação da concentração das ABs nas amostras de atum fresco e em conserva. Legenda: n.d.- não detetado.

ABs (mg/kg)	Atum fresco		Atum congelado	Atum em conserva			
	Músculo Branco	Músculo vermelho	Músculo branco	Paté	Natural	Azeite	Óleo
Tri	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Put	4,81	10,94	7,84	7,56	8,47	4,09	4,53
Cad	144,88	87,86	412,53	130,54	577,90	54,27	81,46
Spm	46,67	47,03	n.d	22,74	28,41	59,90	34,91
His	21,01	19,96	36,22	22,71	26,23	21,69	20,82
Tir	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Spd	26,11	34,19	n.d.	46,38	102,56	43,10	28,72

Segundo a FDA, as sete amostras de atum possuem concentrações de His abaixo dos 50 mg/kg, indicando assim que são seguras para o consumo humano.

De acordo com o estudo realizado por Ruiz-Capillas e Moral [80], estes verificaram que a concentração de ABs (Cad, His, Tir) aumenta ao longo do seu

armazenamento e que estas encontram-se em concentrações mais elevadas no músculo branco do que no músculo vermelho, à exceção da Spd que existe numa concentração superior no músculo vermelho, e da Put que apresenta valores semelhantes em ambos os músculos.

De acordo com a Tabela 9 verifica-se que os resultados estão de acordo com o descrito por Ruiz-Capillas e Moral [80], sendo que a Cad e a His existem em concentrações mais elevadas no músculo branco e a Spd apresenta uma maior concentração no músculo vermelho. Contudo a Put expressa valores mais elevados no músculo vermelho, o que ao comparar com o trabalho obtido por Ruiz-Capillas e Moral [80], são obtidos valores de Put superiores no músculo vermelho comparativamente ao músculo branco, quando o atum se encontra armazenado durante 5 dias a baixas temperaturas (1-2 °C).

Foi possível verificar (Tabela 9) que a Cad possuía valores de concentração mais elevados do que as restantes ABs, para todas as amostras de atum. De acordo com Ruiz-Capillas e Moral [81] a presença inicial de Cad está relacionada com o processo autolítico, sendo posteriormente formada por microrganismos.

Relativamente às amostras em conserva, o atum conservado ao natural foi o que apresentou as concentrações mais elevadas de ABs (à exceção da Spm). Estas diferenças podem estar relacionadas com a afinidade do solvente usado no processo extrativo (ACN), visto que a água tem maior afinidade comparativamente ao azeite/óleo, verificando-se assim valores de concentração mais baixos de ABs nas amostras em conserva com azeite/óleo.

De modo a verificar a qualidade das amostras de atum enlatado foi determinado o IQ (equação 1) implementado por Mietz e Karmas [57]. De acordo com os valores de IQ obtidos (Tabela 10), verificou-se que o atum conservado em azeite, possui um valor de IQ inferior a 1, indicando boa qualidade alimentar sendo seguro para consumo. Contudo, o paté de atum e o atum em conserva ao natural, e em óleo, possuem valores de IQ no intervalo entre 1-10, pelo que são considerados de baixa qualidade, estando assim associados a algum risco de intoxicação quando ingeridos.

Tabela 10. Valores obtidos na determinação do IQ nas amostras de atum enlatado.

Amostras enlatadas	IQ
Paté de atum	2,28
Atum ao Natural	4,64
Atum em Azeite	0,77
Atum em Óleo	1,65

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

4 Conclusões

No pescado fresco, o teor de ABs é baixo. A sua deterioração potencia um aumento do teor destes compostos e, conseqüentemente, origina riscos para a saúde humana. Neste trabalho, o principal objetivo foi a validação de uma metodologia para quantificar ABs em diferentes amostras de atum e a verificação da garantia de qualidade das amostras e a sua segurança para o consumo humano, por comparação com os limites de segurança estabelecidos.

Para proceder à identificação e quantificação das ABs, desenvolveu-se uma metodologia analítica, baseada na USAMET como técnica extrativa, seguida da derivatização com DnsCl e posterior análise cromatográfica por UHPLC-FLR. Procedeu-se à validação da metodologia analítica, tendo-se obtido resultados satisfatórios para os parâmetros analíticos considerados. Nos resultados de percentagem de recuperação obtiveram-se valores satisfatórios entre 76-107%. Obtiveram-se coeficientes de correlação superiores (R^2) a 0,9809, valores de LOD que variaram entre 0,98-8,57 mg/kg, e de LOQ entre 3,20-25,64 mg/kg. A precisão intradia variou entre 5,24% e 11,64% e a interdia entre 8,21% e 14,20%. O efeito de matriz variou na gama 2,01-50%.

Ao analisar os valores de His presentes nas amostras de atum foi possível verificar que nenhuma ultrapassou o nível de segurança proposto pela FDA, podendo-se assim concluir que as amostras de atum analisadas se encontravam em condições próprias para consumo.

Esta metodologia permite detetar e quantificar várias ABs no atum. Contudo, a ausência de legislação no que diz respeito aos limites máximos permitidos, de algumas ABs nos alimentos, como por exemplo, a Put e a Cad, impede-nos de saber se as quantidades presentes nas amostras constituem ou não um risco para a saúde humana.

Uma próxima etapa para este trabalho seria a análise de um maior número de ABs, com tempos de análise reduzidos. Outro aspeto a aperfeiçoar seria a análise do atum em diferentes estágios de decomposição, bem como em diferentes etapas de processamento. De modo a valorizar e alargar o espectro de aplicação do método, seria importante a sua aplicação em diferentes matrizes alimentares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

- [1] Antoine FR, Wei CI, Littell RC, et al. Free amino acids in dark- and white-muscle fish as determined by o-phthaldialdehyde precolumn derivatization. *J Food Sci* 2001; 66: 72–77.
- [2] Andrade SDCS, Mársico ET, Godoy RL de O, et al. Chemical Quality Indices for Freshness Evaluation of Fish. *J Food Stud* 2014; 3: 71–87.
- [3] Cardozo M, Lima KSC, França TCC, et al. Biogenic Amines: A Public Health Problem. *Rev Virtual Quim* 2013; 5: 149–168.
- [4] Reis P. Notícias ao Minuto - Atum adulterado foi retirado do mercado em Portugal, <https://www.noticiasao minuto.com/pais/873338/atum-adulterado-foi-retirado-do-mercado-em-portugal> (acedido 21 Julho 2018).
- [5] Visciano P, Schirone M, Tofalo R, et al. Biogenic Amines in Raw and Processed Seafood. *Front Microbiol* 2012; 3: 1–10.
- [6] Ferreira IMPLVO, Pinho O. Biogenic amines in Portuguese traditional foods and wines. *J Food Prot* 2006; 69: 2293–2303.
- [7] Esatbeyoglu T, Ehmer A, Chaize D, et al. Quantitative Determination of Spermidine in 50 German Cheese Samples on a Core-Shell Column by High-Performance Liquid Chromatography with a Photodiode Array Detector Using a Fully Validated Method. *J Agric Food Chem* 2016; 64: 2105–2111.
- [8] Lázaro De La Torre CA, Conte-Junior CA. Chromatographic methods for biogenic amines determination in foods of animal origin. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2013; 50: 430–446.
- [9] De Figueiredo TC, De Assis DCS, Menezes LDM, et al. HPLC-UV method validation for the identification and quantification of bioactive amines in commercial eggs. *Talanta* 2015; 142: 240–245.
- [10] Alonso-Lomillo MA, Domínguez-Renedo O, Matos P, et al. Disposable biosensors for determination of biogenic amines. *Anal Chim Acta* 2010; 665: 26–31.

- [11] Muscarella M, Lo Magro S, Campaniello M, et al. Survey of Histamine levels in fresh fish and fish products collected in Puglia (Italy) by ELISA and HPLC with fluorimetric detection. *Food Control* 2013; 31: 211–217.
- [12] FAO. O peixe, fonte de alimentação, meio de subsistência e de comércio, www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf (acedido 11 Junho 2018).
- [13] Amaral CRL, Maciel V, Goldenberg-Barbosa R, et al. Tuna fish identification using mtDNA markers. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* 2017; 6: e471–e473.
- [14] FAO. *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome, <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf> (acedido 13 Junho 2018).
- [15] Graham JB, Dickson KA. Tuna comparative physiology. *J Exp Biol* 2004; 207: 4015–4024.
- [16] FAO. Fisheries and Aquaculture Department. Biological characteristics of tuna, <http://www.fao.org/fishery/> (acedido 27 Julho 2018).
- [17] Li Q, Li DP, Qin N, et al. Comparative studies of quality changes in white and dark muscles from common carp (*Cyprinus carpio*) during refrigerated (4 degrees C) storage. *Int J Food Sci Technol* 2016; 51: 1130–1139.
- [18] Ormanci HB, Arik Colakoglu F. Changes in Biogenic Amines Levels of Lakerda (Salted Atlantic Bonito) During Ripening at Different Temperatures. *J Food Process Preserv* 2017; 41: e12736.
- [19] FAO. Quality and quality changes in fresh fish. *Assessment of fish quality*, <http://www.fao.org/docrep/V7180E/V7180e09.htm> (acedido 13 Julho 2018).
- [20] Da Silva TM. *Otimização e validação de método para determinação de Histamina em pescado*. Dissertação apresentada na Faculdade de Farmácia da UFMG para obtenção do grau de mestre, 2008.
- [21] Freitas DDGC, do Amaral GV. *Método do Índice de Qualidade (MIQ) para a Avaliação Sensorial da Qualidade de Pescado*, www.ctaa.embrapa.br (acedido 24 Julho 2018).
- [22] Amaral GV do, Freitas DDGC. Quality index method to determine the freshness of

- fish. *Cienc Rural* 2013; 43: 2093–2100.
- [23] WWF. *Seafood and the Mediterranean: Local Tastes, Global Markets*, https://www.fishforward.eu/wp-content/uploads/2015/06/WWF_Seafood-and-the-Mediterranean_final.pdf (acedido 13 Junho 2018).
- [24] Luo L, Xu Z-L, Yang J-Y, et al. Synthesis of Novel Haptens and Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantification of Histamine in Foods. *J Agric Food Chem* 2014; 62: 12299–12308.
- [25] Al Bulushi I, Poole S, Deeth HC, et al. Biogenic amines in fish: Roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation-A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009; 49: 369–377.
- [26] Önal A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem* 2007; 103: 1475–1486.
- [27] Alberto MR, Arena ME, De Nadra MCM. Differences between biogenic amine detection by HPLC methods using OPA and dansyl derivates. In: *Public Health Microbiology*. New Jersey: Humana Press, 2004, pp. 481–487.
- [28] Aflaki F, Ghoulipour V, Saemian N, et al. A simple method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Anal Methods* 2014; 6: 1482–1487.
- [29] Mohammed GI, Bashammakh AS, Alsibaai AA, et al. A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. *Trends Anal Chem* 2016; 78: 84–94.
- [30] Loizzo MR, Menichini F, Picci N, et al. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends Food Sci Technol* 2013; 30: 38–55.
- [31] Křížek M, Dadáková E, Vácha F, et al. Comparison of the formation of biogenic amines in irradiated and smoked fish. *Eur Food Res Technol* 2017; 243: 1989–1995.
- [32] Aflaki F, Ghoulipour V, Saemian N, et al. Biogenic Amine Contents in Non-alcoholic

- Beers: Screening and Optimization of Derivatization. *Food Anal Methods* 2014; 7: 713–720.
- [33] Guillén-Velasco S, Ponce-Alquicira E, Saravia AFG, et al. Histamine production by two Enterobacteriaceae strains isolated from tuna (*Thunnus thynnus*) and jack mackerel (*Trachurus murphyii*). *Int J Food Prop* 2004; 7: 91–103.
- [34] Hungerford JM. Scombroid poisoning: A review. *Toxicon* 2010; 56: 231–243.
- [35] FAO. *Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products*. Rome, 2012.
- [36] Altieri I, Semeraro A, Scalise F, et al. European official control of food: Determination of Histamine in fish products by a HPLC-UV-DAD method. *Food Chem* 2016; 211: 694–699.
- [37] Yesudhasan P, Al-Zidjali M, Al-Zidjali A, et al. Histamine levels in commercially important fresh and processed fish of Oman with reference to international standards. *Food Chem* 2013; 140: 777–783.
- [38] Nei D, Nakamura N, Ishihara K, et al. A rapid screening of Histamine concentration in fish fillet by direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS). *Food Control* 2017; 75: 181–186.
- [39] National Institute of Standards and Technology. 1,5-Pentanediamine, <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=462-94-2> (acedido 24 Julho 2018).
- [40] Graham JB, Dickson KA. Anatomical and physiological specializations for endothermy. In: *Fish Physiology*. Academic Press, pp. 121–165.
- [41] Hussain A, Saraiva LR, Ferrero DM, et al. High-affinity olfactory receptor for the death-associated odor Cadaverine. *Proc Natl Acad Sci* 2013; 110: 19579–19584.
- [42] Sentellas S, Núñez Ó, Saurina J. Recent Advances in the Determination of Biogenic Amines in Food Samples by (U)HPLC. *J Agric Food Chem* 2016; 64: 7667–7678.
- [43] National Institute of Standards and Technology. 1,4-Butanediamine, <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C110601&Mask=4> (acedido 24 Julho 2018).

- [44] National Institute of Standards and Technology. Spermine, <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=71-44-3> (acedido 24 Julho 2018).
- [45] DrugBank. Spermidine, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB03566> (acedido 24 Julho 2018).
- [46] Yamamoto Y, Makino T, Kudo H, et al. Expression and distribution patterns of Spermine, Spermidine, and Putrescine in rat hair follicle. *Histochem Cell Biol* 2018; 149: 161–167.
- [47] Zhang H, Wang J, Li L, et al. Spermine and Spermidine reversed age-related cardiac deterioration in rats. *Oncotarget* 2017; 8: 64793–64808.
- [48] Tašev K, Ivanova-Petropulos V, Stefova M. Ultra-Performance Liquid Chromatography-Triple Quadruple Mass Spectrometry (UPLC-TQ/MS) for Evaluation of Biogenic Amines in Wine. *Food Anal Methods* 2017; 10: 4038–4048.
- [49] Kousara S, Anjuma SN, Jaleela F, et al. Biomedical Significance of Tryptamine: A Review. *J Pharmacovigil* 2017; 5: 1–6.
- [50] Baylis C, Uyttendaele M, Joosten H, et al. *The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry*, <http://ils.eu/wp-content/uploads/sites/3/2016/06/EP-Enterobacteriaceae.pdf> (acedido 12 Julho 2018).
- [51] Tao Z, Sato M, Han Y, et al. A simple and rapid method for Histamine analysis in fish and fishery products by TLC determination. *Food Control* 2011; 22: 1154–1157.
- [52] EFSA. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J* 2011; 9: 2393.
- [53] Bilgin B, Genççelep H. Determination of biogenic amines in fish products. *Food Sci Biotechnol* 2015; 24: 1907–1913.
- [54] Byun BY, Mah JH. Occurrence of Biogenic Amines in Miso, Japanese Traditional Fermented Soybean Paste. *J Food Sci* 2012; 77: T216–T223.
- [55] Biji KB, Ravishankar CN, Venkateswarlu R, et al. Biogenic amines in seafood: a review. *J Food Sci and Technol* 2016; 53: 2210–2218.

- [56] FAO/WHO. *Joint FAO/WHO food standards programme Codex Committee on fish and fishery products*, http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFFP/ccffp32/fp32_14e.pdf (acedido 20 Julho 2018).
- [57] Mietz JL, Karmas E. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *J Food Sci* 1977; 42: 155–158.
- [58] Veciana-Nogués MT, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC. Biogenic Amines in Fresh and Canned Tuna. Effects of Canning on Biogenic Amine Contents. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 4324–4328.
- [59] Lonvaud-Funel A. Biogenic amines in wines: Role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 199: 9–13.
- [60] Manetta AC, Di Giuseppe L, Tofalo R, et al. Evaluation of biogenic amines in wine: Determination by an improved HPLC-PDA method. *Food Control* 2016; 62: 351–356.
- [61] Souza ALM de, Calixto FAA, Mesquita E de FM de, et al. Histamine and traceability of fish: literature review. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)* 2015; 82: 1–11.
- [62] UCT. QuEChERS, <https://chromspec.com/pdf/e/uct19.pdf> (acedido 17 Julho 2018).
- [63] Prestes OD, Friggi CA, Adaime MB, et al. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim Nova* 2009; 32: 1620–1634.
- [64] Correia-Sá L, Norberto S, Delerue-Matos C, et al. Micro-QuEChERS extraction coupled to GC–MS for a fast determination of Bisphenol A in human urine. *J Chromatogr B* 2018; 1072: 9–16.
- [65] Pereira JAM, Porto-Figueira P, Andrade B, et al. Biogenic amines in food: Occurrence and analytical challenges for their analysis. In: *Biogenic Amines (BA): Origins, Biological Importance and Human Health Implications*. Nova Science Publishers, 2017, pp. 233–268.

- [66] Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 2003; 86: 412–431.
- [67] Boonprasert R, Tummarintra P, Plabjuj P, et al. Development of the Method of the Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) with Photo Diode Array Detector for Determination of 7 Tricyclic Antidepressants Concentrations in Human Plasma. *Siriraj Med J* 2017; 65: 100–104.
- [68] Ribani M, Grespan Bottoli CB, Collins CH, et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova* 2004; 27: 771–780.
- [69] Mendes BR. *Avaliação do perfil urinário de biomarcadores do stress oxidativo e a sua correlação com as doenças cardiovasculares*. Dissertação apresentada Universidade da Madeira para obtenção do grau de mestre, 2012.
- [70] Araujo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J Chromatogr B* 2009; 877: 2224–2234.
- [71] Łozowicka B, Rutkowska E, Jankowska M. Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD. *Environ Sci Pollut Res* 2017; 24: 7124–7138.
- [72] Waters. Photodiode Array Detector, <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500121902rc.pdf> (acedido 12 Julho 2018).
- [73] Swartz M. HPLC detectors: A brief review. *J Liq Chrom Relat Tech* 2010; 33: 1130–1150.
- [74] Choi H. Advances of photo diode array. *Man SCINCO Co Ltd* 2004; 1–9.
- [75] Waters. ACQUITY UPLC Fluorescence Detector, <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500142403rb.pdf> (acedido 28 Julho 2018).
- [76] Fountain KJ, Hewitson HB, Iraneta PC, et al. Practical Applications of Charged Surface Hybrid (CSH) Technology. 2010; 1–6.
- [77] Waters. Increase speed, sensitivity, and resolution with UPLC column technology,

<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006173en.pdf>

(acedido 19 Julho 2018).

- [78] Coordenação Geral de Acreditação. Orientação sobre validação de métodos analíticos. *revisão 05*, 2016; 1–31.
- [79] Ich. Ich Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. *Int Conf Harmon* 2005; 1994: 17.
- [80] Ruiz-Capillas C, Moral A. Free amino acids and biogenic amines in red and white muscle of tuna stored in controlled atmospheres. *Amino Acids* 2004; 26: 125–132.
- [81] Ruiz-Capillas C, Moral A. *Production of Biogenic Amines and Their Potential Use as Quality Control Indices for Hake (Merluccius merluccius, L.) Stored in Ice*, *J Food Sci* 2001; 66: 1030-1032.

ANEXOS

Anexos

Comparou-se a performance das colunas Acquity UPLC BEH C18 e Acquity UPLC CSH C18, de modo a selecionar a fase estacionária mais adequada para a resolução das ABs. A Figura 1.A. representa um cromatograma comparativo da resolução das 2 colunas em estudo estão representadas a comparação entre ambas as colunas.

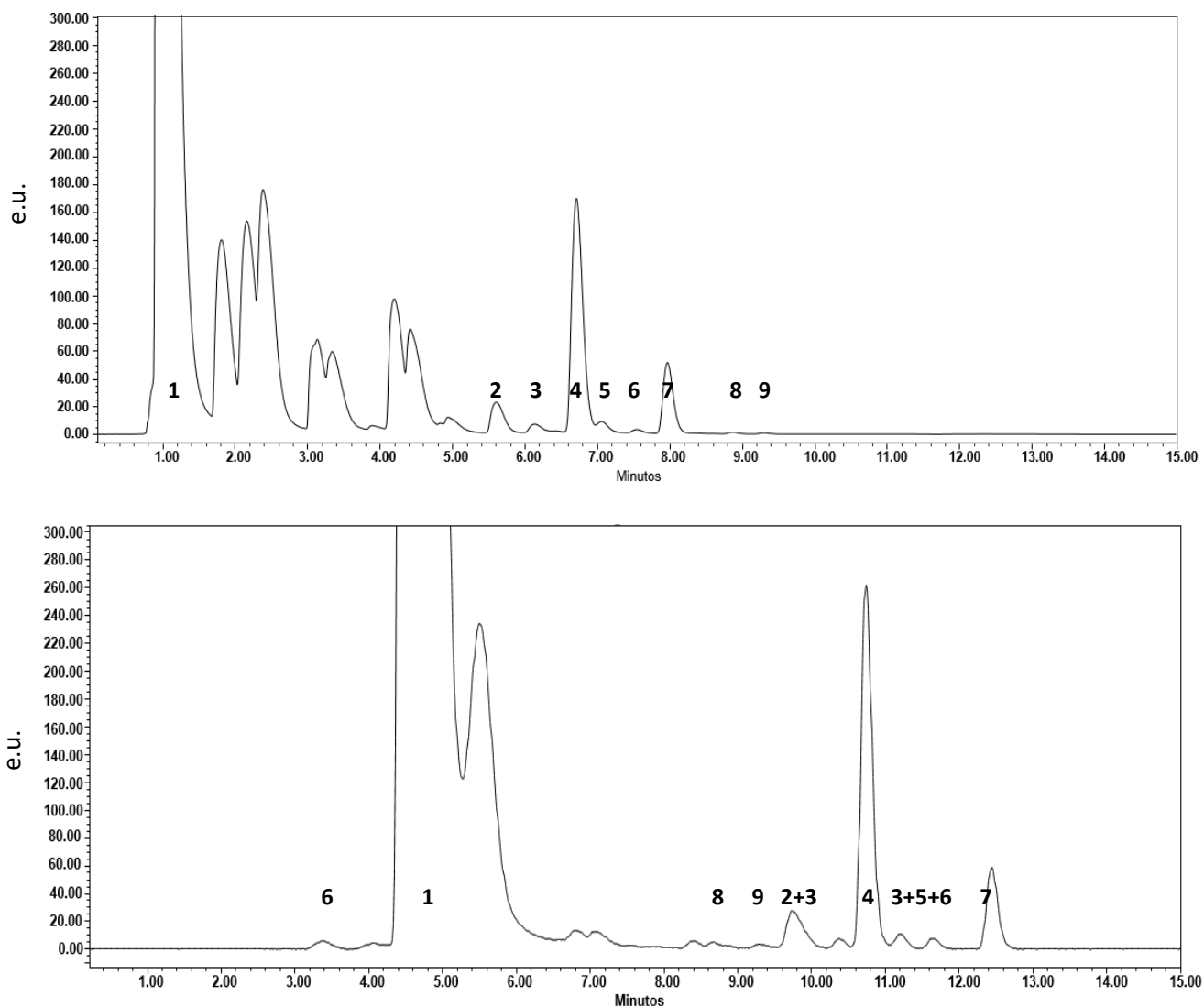


Figura 1.A. Comparação da separação das ABs nas colunas BEH e CSH, respetivamente. Legenda: 1-DnsCl; 2-Tri; 3-Spd; 4-Put; 5-Cad; 6-His; 7- PI; 8-Tir; 9-Spm

No estudo da seletividade foi possível identificar as aminas de interesse, através da fortificação da amostra com as ABs numa concentração de 20 g/L (Figura 2.A).

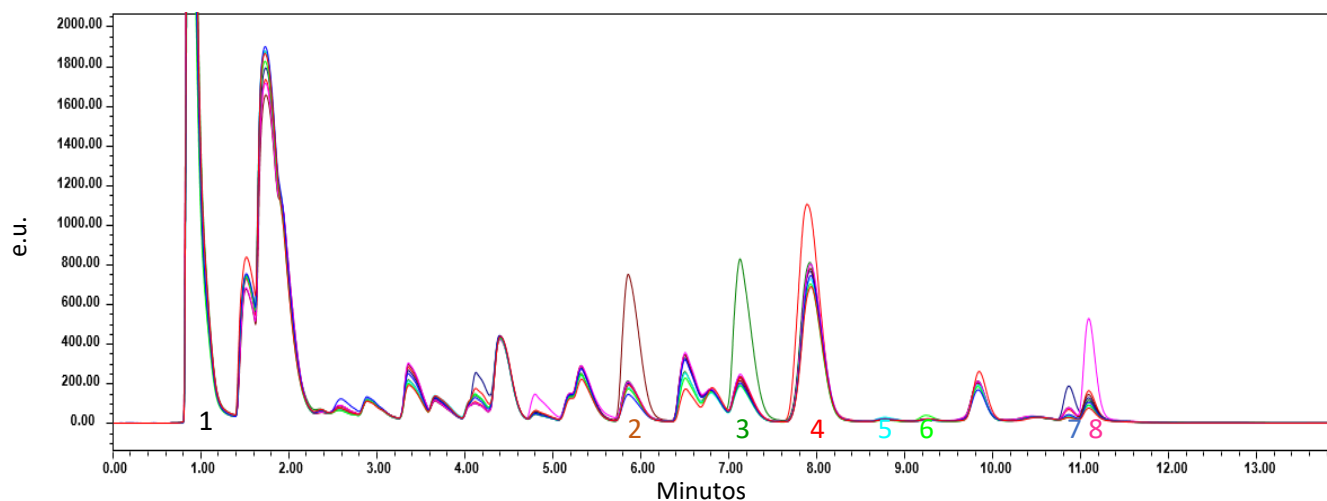
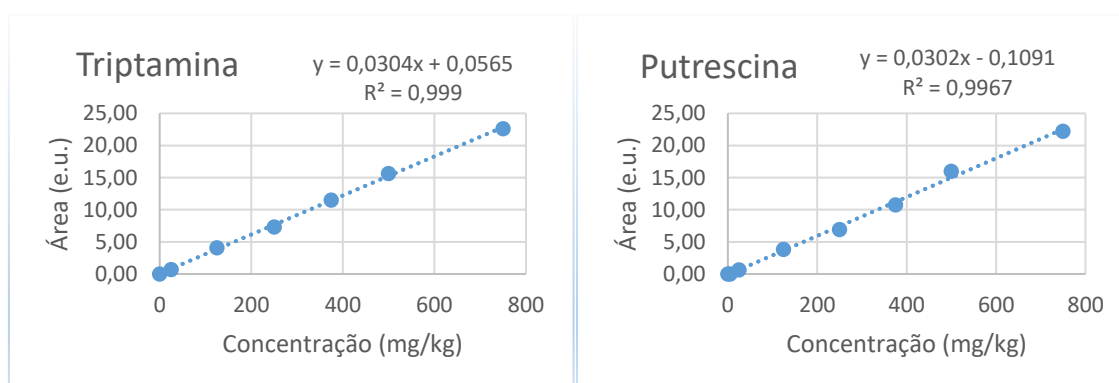


Figura 2.A. Representação cromatográfica do tempo de retenção das ABs, confirmadas através da fortificação com a concentração de 20 g/L. Legenda: 1-DnsCl, 2-Tri, 3-Put, 4-Cad, 5-Spm, 6-His, 7-Tir, 8-Spd.

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curvas de calibração, na gama de concentrações desde os 5 aos 750 mg/kg, sendo que em todas as concentrações foi adicionado o PI (2g/L). A Figura 3.A ilustra as curvas de calibração obtidas para cada uma das ABs.



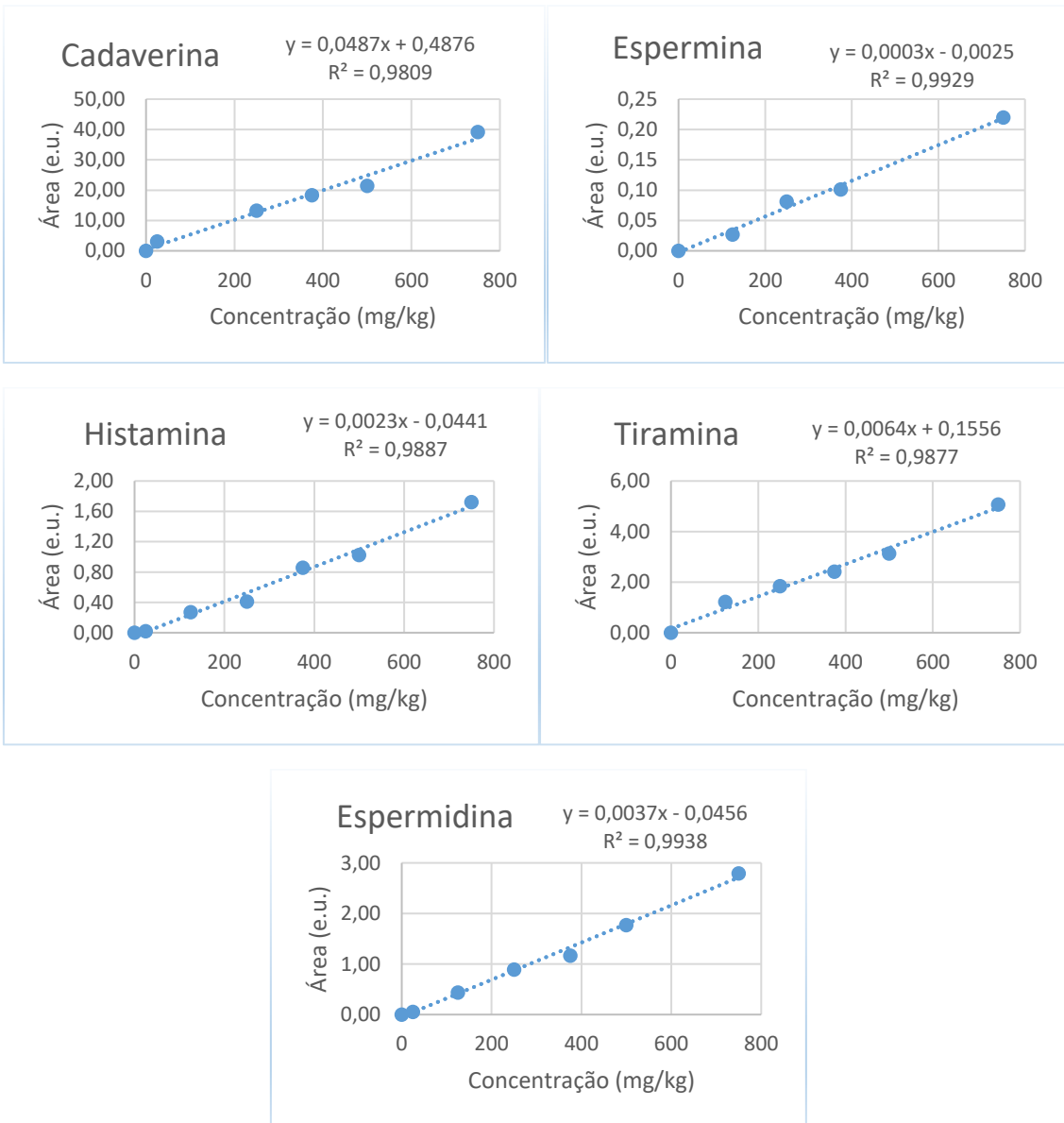


Figura 3.A. Curvas de calibração obtidas para cada uma das ABs.