

Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação de aminas biogénicas em enchidos

Fátima Susana Gonçalves Claro

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia e de Gestão de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química

Orientado por
Doutora Joana Amaral
Professora Doutora Susana Casal

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

Bragança
Setembro, 2009

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Engenharia Química
apresentada à Escola Superior de Tecnologia e de Gestão
do Instituto Politécnico de Bragança

Trabalho realizado no Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sob orientação da Doutora Joana Andréa Soares Amaral (ESTiG/IPB) e da Professora Doutora Susana Isabel Pereira Casal (FFUP)

À minha Mãe
À minha irmã

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer em primeiro lugar à minha orientadora Doutora Joana Amaral, pelos conhecimentos científicos transmitidos, pela sua simpatia, pela sua disponibilidade, pelas horas perdidas comigo, pelo seu sacrifício pessoal, pela sua generosidade, pela sua amizade e principalmente pela sua imprescindível ajuda sem a qual não teria conseguido.

À minha co-orientadora a professora Doutora Susana Casal pelos conhecimentos científicos que me transmitiu, pela sua imensa ajuda, pela sua disponibilidade, pelo seu incentivo constante e pelas horas perdidas comigo quando surgiram algumas dificuldades, pelo seu esforço em proporcionar todos os meios necessários para a realização deste trabalho, pela sua amizade e principalmente pela sua paciência incessante.

À professora Doutora Beatriz Oliveira pela oportunidade concedida de realizar a parte experimental desta dissertação no serviço de Bromatologia, pela sua simpatia, pela sua preocupação e principalmente pela forma carinhosa com que sempre me tratou.

Às pessoas do serviço de Bromatologia que me acolheram de forma carinhosa, e por se terem mostrado sempre disponíveis quando necessitava de ajuda.

Ao Armindo por toda a ajuda que me prestou, pelo tempo perdido comigo e pela sua simpatia constante.

À Heryka por toda a ajuda e principalmente pelas vezes que ficou a fazer-me companhia no laboratório.

Aos meus amigos que me ajudaram e incentivaram.

À minha família, em especial à minha mãe e à minha irmã por todo o apoio dado desde o primeiro momento, pelo incentivo e pela compreensão demonstrada pela minha ausência.

RESUMO

Os enchidos são um produto muito consumido no mercado português, e como acontece na maior parte dos produtos ricos em proteínas e em compostos azotados, podem apresentar a formação de compostos indesejáveis como as aminas biogénicas durante o armazenamento, a maturação e a fermentação, sendo por isso necessário o seu estudo. Com este trabalho pretendeu-se desenvolver um método cromatográfico que não usasse acetonitrilo como eluente orgânico (como acontece na maior parte das referências bibliográficas consultadas), uma vez que este solvente se encontra actualmente com pouca oferta comercial atingindo preços exorbitantes. Pretendia-se igualmente o desenvolvimento de um método cromatográfico que permitisse uma redução no tempo de análise, traduzindo-se numa redução do consumo de eluentes, logo numa metodologia económica e ambientalmente mais amigável. Para tal recorreu-se à utilização de duas colunas cromatográficas, uma monolítica de fase reversa e uma coluna tradicional de sílica, não se verificando diferenças significativas que justificassem o uso da coluna monolítica. Neste estudo desenvolveu-se uma metodologia usando a cromatografia líquida de elevada performance (HPLC), tendo sido testados dois derivatizantes diferentes, cloreto de dansilo e cloreto de dabsilo. Para ambos procedeu-se ao estudo e optimização de parâmetros da reacção de derivatização e à optimização de eluentes e gradiente usados na análise cromatográfica. Concluiu-se que o cloreto de dabsilo era aquele que apresentava melhores resultados. Depois de desenvolvido o método, procedeu-se ao estudo dos parâmetros de validação. Por último, o método foi aplicado a amostras de enchidos comerciais para quantificação das aminas biogénicas em cada uma delas.

Palavras chave: Aminas Biogénicas; HPLC-UV; derivatização com cloreto de dansilo; derivatização com cloreto de dabsilo; enchidos

ABSTRACT

Sausages are a product widely consumed by the Portuguese population, and, as in most products rich in protein and nitrogen compounds, may present undesirable compounds such as biogenic amines originated during the storage, ripening and fermentation.

The aim of this work was to develop a chromatographic method avoiding the use of acetonitrile as organic solvent (as in most of works reported in the available literature), since this solvent is currently in short supply business, thus reaching exorbitant prices. It was also the aim of this work to develop a chromatographic method that allows a reduction in analysis time, resulting in a more economic and environmentally friendly methodology by reducing the consumption of organic solvents. To achieve this, two chromatographic columns were tested, a monolithic reversed-phase column and a traditional silica. We concluded that there were no significant differences that justify the use of the more expensive monolithic column. In this study a high performance liquid chromatographic (HPLC) methodology was developed, and two different derivatizing reagents, dansyl chloride and dabsyl chloride were tested. For both, a study of the derivatization reaction parameters and of chromatographic analysis was performed. It was concluded that the dabsyl chloride was the one who had the best results. After being developed, the method was validated. Finally, the method was applied to sausage samples bought in a local market, for the evaluation of biogenic amines content.

Keywords: Biogenic amines; HPLC-UV; dansyl chloride derivatization; dabsyl chloride derivatization; sausages

ABREVIATURAS

AB	Aminas Biogénicas
ACCQ	6 – amino-quinolil- <i>N</i> -hidroxisuccinimidil carbamato
AG	Agmatina
CA	Cadaverina
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector de díodos
DnCl	Cloreto de dansilo
DabCl	Cloreto de dabsilo
ED	Espermidina
EM	Espermina
FE	2-feniletilamina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
HCl	Ácido Clorídrico
HI	Histamina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IAB	Índice de aminas biogénicas
IMAO	Inibidores da monoamino-oxidase
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
ME	2-mercaptoetanol
n	Número de medições
NOC-Cl	Cloreto de 2-naftiloxicarbonilo
OC	Octopamina
OPA	<i>o</i> -ftaldialdeído
PI	Padrão interno
PITC	Fenilisotiocoanato
PU	Putrescina
R ²	Coeficiente de correlação quadrático
rpm	Rotações por minuto
SE	Serotonina
TCA	Ácido tricloroacético
TDPA	Ácido 3,3-tiodipropiónico
TI	Tiramina
t _R	Tempo de retenção (min)
TR	Triptamina
UV-Vis	Ultravioleta-visível

Índice

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ABREVIATURAS	iv
OBJECTIVOS DO TRABALHO E ORGANIZAÇÃO DA TESE	1
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Aminas biogénicas: origem e classificação	3
1.2. Aminas biogénicas nos alimentos	4
1.3. Aminas biogénicas em carne e em produtos cárneos	5
1.3.1. Ocorrência de aminas biogénicas em carne e em produtos cárneos	6
1.4. Determinação de aminas biogénicas em carne e em produtos cárneos	10
1.4.1. Extracção e purificação dos extractos	10
1.4.2. Metodologias analíticas para a detecção e quantificação de aminas biogénicas	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. Amostras	16
2.2. Reagentes e padrões	17
2.3. Preparação de soluções	17
2.4. Processo extractivo	19
2.5. Condições de derivatização	19
2.5.1. Cloreto de dansilo	19
2.5.2. Cloreto de dabsilo	19
2.6. Análise cromatográfica	20
2.6.1. Sistema cromatográfico	20
2.6.2. Condições cromatográficas	20
3. Resultados e discussão	22
3.1. Optimização das condições analíticas	23
3.1.1. Estudo com o cloreto de dansilo	23
3.1.2. Estudo com o cloreto de dabsilo	29
3.2. Validação do método	36
3.2.1. Linearidade.....	36
3.2.2. Limites de detecção e de quantificação	38
3.2.3. Precisão da extracção	38
3.2.4. Recuperação	39
3.3. Análise de aminas biogénicas em enchidos por HPLC.....	41
4. CONCLUSÃO	45
BIBLIOGRAFIA	48

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação das reacções de derivatização das aminas biogénicas com o cloreto de dansilo (a) e com o <i>o</i> -ftaldialdeído (b).....	12
Figura 2 – Equipamento de HPLC utilizado neste trabalho.	20
Figura 3 – Cromatograma de uma mistura de padrões com uma concentração de 100µg/ml derivatizada com cloreto de dansilo a 254nm.....	24
Figura 4 – Resultados obtidos para cada amina a diferentes valores de pH durante a derivatização	29
Figura 5 – Cromatogramas de uma mistura de padrões com uma concentração de 2,5µmol/ml obtidos com eluentes orgânicos diferentes	32
Figura 6 – Cromatograma de uma mistura de padrões com uma concentração de 1,25 µmol/ml, derivatizada com cloreto de dabsilo e visualizada a 436nm.....	33
Figura 7 – Curvas de calibração para os compostos em estudo, derivatizados com cloreto de dabsilo e visualizados cromatograficamente a 436nm.....	37
Figura 8 – Cromatograma obtido para o enchido C6 derivatizado com cloreto de dabsilo a 436nm	41

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Estrutura química das aminas biogénicas mais frequentes em alimentos.	3
Tabela 2 – Trabalhos realizados no estudo das aminas biogénicas em carne e em produtos cárneos.....	14
Tabela 3 – Características dos enchidos em estudo.	16
Tabela 4 – Características das substâncias padrão utilizadas	17
Tabela 5 – Registo das massas pesadas de cada composto e da concentração da amina livre nas soluções mãe.	18
Tabela 6 – Programa de eluição usado nas análises efectuadas com o cloreto de dansilo e o cloreto de dabsilo.....	21
Tabela 7 – Resultados dos rácios obtidos para cada relação temperatura/ tempo de derivatização obtidos com o carbonato e o bicarbonato de sódio.....	27
Tabela 8 – Registo dos valores de pH ao longo da derivatização.....	28
Tabela 9 – Resultados dos rácios obtidos para cada relação concentração de cloreto de dabsilo/ tempo de derivatização.	35
Tabela 10 – Parâmetros relativos à validação do método.	40
Tabela 11 – Registo do teor de aminas biogénicas obtido para cada amostra.....	42

OBJECTIVOS DO TRABALHO E ORGANIZAÇÃO DA TESE

As aminas biogénicas podem ser encontradas numa grande variedade de alimentos, tais como: chocolate, peixe, cerveja, vinho, queijos curados, fruta, vegetais, produtos fermentados de carne ou de vegetais, café, bebidas alcoólicas, entre outros. Considerando que estes compostos se formam por descarboxilação de aminoácidos precursores e que esta reacção é mediada por enzimas com origem microbiana, alimentos ricos em proteínas, quando submetidos a condições que permitam o desenvolvimento da actividade bacteriana, podem apresentar quantidades de aminas biogénicas consideráveis. Desta forma, um teor elevado de aminas biogénicas pode ser indicativo de más condições higieno-sanitárias de matérias-primas, pode reflectir um incumprimento das regras de higiene durante a produção ou armazenamento dos produtos, podendo ser ainda um parâmetro útil para a monitorização da degradação de determinados alimentos ao longo do tempo. Por outro lado, a generalidade das aminas biogénicas são consideradas como componentes tóxicos indesejáveis, sendo por isso importante o seu estudo, tanto a nível da segurança alimentar, como da qualidade dos alimentos, visto que teores elevados destas aminas podem desencadear reacções adversas nos consumidores.

Apesar da unanimidade verificada quanto à eleição da técnica analítica utilizada para este propósito, a cromatografia líquida de elevada performance (HPLC), verificam-se diversas diferenças nas metodologias de extracção e derivatização utilizadas. No entanto, todas as metodologias cromatográficas utilizam solventes orgânicos, produzindo elevadas quantidades de resíduos poluentes. Acresce o facto de o solvente maioritário ser sistematicamente o acetonitrilo, um solvente que actualmente se encontra com pouca oferta comercial, atingindo, por isso, preços verdadeiramente exorbitantes, sendo urgente a disponibilização de alternativas. Assim, o primeiro objectivo deste trabalho analítico prendeu-se com o desenvolvimento de um método cromatográfico que não utilizasse acetonitrilo e simultaneamente permitisse uma redução do consumo total de solventes orgânicos por amostra.

Simultaneamente verifica-se a existência de uma vasta gama de metodologias utilizadas na derivatização destes compostos mas poucos estudos que comparem resultados obtidos com diferentes derivatizantes, constituindo essa tarefa o segundo objectivo do trabalho.

Com base na nova metodologia desenvolvida pretendeu-se quantificar as aminas biogénicas em enchidos, alimentos tradicionalmente consumidos pela população Portuguesa. Este estudo teve como principal motivação o facto de existirem poucos

dados relativos à presença destes compostos nos enchidos Portugueses, apesar de disponibilizados noutros países europeus.

A presente dissertação encontra-se estruturada em quatro capítulos. O primeiro capítulo corresponde a uma introdução teórica ao estudo das aminas biogénicas e referência a trabalhos consultados na literatura disponível. Neste capítulo descreve-se a ocorrência destes compostos em alimentos diversos, com especial incidência para os produtos cárneos. Referem-se ainda as metodologias analíticas mais frequentemente utilizadas para a determinação destes compostos em matrizes alimentares. No segundo capítulo são apresentados os materiais e métodos utilizados neste trabalho. Neste capítulo encontra-se descrito o procedimento usado para efectuar a extracção das aminas da matriz estudada, bem como para a sua derivatização. Apresenta-se ainda uma descrição pormenorizada do sistema e condições cromatográficas usadas neste estudo.

No terceiro capítulo apresentam-se os resultados obtidos e sua discussão. Este encontra-se subdividido em três pontos principais. No primeiro ponto referem-se os resultados obtidos na optimização das condições cromatográficas, detalhando-se os ensaios para os dois derivatizantes testados (cloreto de dansilo e o cloreto de dabsilo). O segundo ponto, diz respeito à validação do método seleccionado, encontrando-se descritos os resultados obtidos para cada parâmetro analítico avaliado, nomeadamente: a linearidade, limites de detecção e quantificação, a precisão e a recuperação. Por último, apresentam-se os resultados referentes à aplicação da metodologia em amostras reais de enchidos de diversas zonas de Portugal, adquiridas em diversas superfícies comerciais.

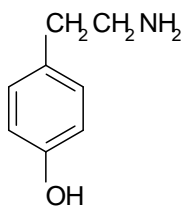
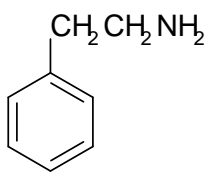
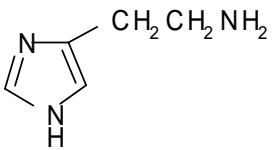
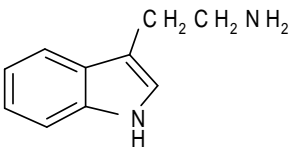
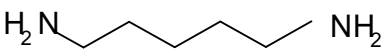
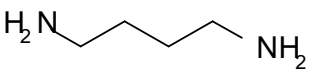
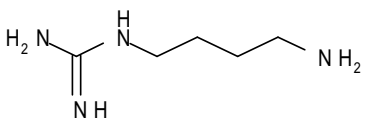
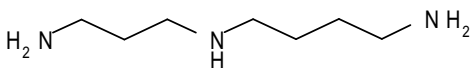
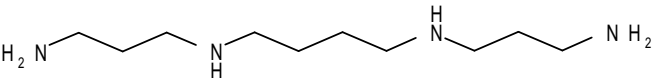
No quarto capítulo, apresenta-se uma sinopse das conclusões retiradas sobre este estudo bem como algumas sugestões para trabalhos futuros. Por fim, apresenta-se uma listagem alfabética das referências bibliográficas utilizadas e citadas ao longo deste trabalho.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aminas biogénicas: origem e classificação

As aminas biogénicas são compostos orgânicos nitrogenados, de natureza básica, com actividade biológica. Estes compostos estão associados ao metabolismo dos seres vivos em geral, nomeadamente animais, plantas e microrganismos, sendo encontrados numa ampla variedade de produtos alimentares (Vidal-Carou et al., 2009). Em função da sua estrutura química, as aminas biogénicas mais comumente encontradas em alimentos podem ser agrupadas em monoaminas aromáticas, aminas heterocíclicas, diaminas alifáticas e poliaminas alifáticas (Vidal-Carou et al., 2009). Os diferentes compostos pertencentes a cada um dos grupos referidos e as respectivas estruturas podem ser consultadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Estrutura química das aminas biogénicas mais frequentes em alimentos. [Fonte: Önal, 2007]

Monoaminas aromáticas	 Tiramina	 2-Feniletilamina
Aminas heterocíclicas	 Histamina	 Triptamina
Diaminas alifáticas	 Cadaverina	 Putrescina
Poliaminas alifáticas	 Agmatina	 Espermidina
	 Espermina	

Classicamente, e dependendo da sua síntese/origem, as aminas biogénicas são definidas como sendo de "origem biogénica" ou de "origem endógena/natural" (Vidal-Carou et al., 2009). Contudo, por vezes, não há uma clara divisão entre estas duas categorias. No primeiro caso, as aminas biogénicas são resultantes do metabolismo microbiano, através da descarboxilação de aminoácidos precursores. Dentro deste grupo encontra-se a tiramina, a 2-feniletilamina, a histamina, a triptamina, a cadaverina, a putrescina e a agmatina, as quais resultam da descarboxilação da tirosina, da fenilalanina, da histidina, do triptofano, da lisina, da ornitina e da arginina, respectivamente. As enzimas descarboxilases responsáveis pela síntese destas aminas biogénicas em alimentos são principalmente de origem bacteriana e normalmente induzidas por determinadas condições ambientais (por exemplo, pH ácido desfavorável ao crescimento microbiano). As poliaminas naturais têm origem endógena, resultando de processos metabólicos intracelulares, e estão presentes nos alimentos em concentrações não tóxicas, sendo essenciais para diversos organismos vivos. Geralmente, considera-se que as poliaminas alifáticas espermina e espermidina são as aminas mais representativas desta categoria.

1.2. Aminas biogénicas nos alimentos

As aminas biogénicas podem-se encontrar numa vasta gama de alimentos e produtos alimentares, tais como: chocolate, peixes e produtos à base de peixe, mariscos, cerveja, vinho tinto, queijos curados (Vidal-Carou et al., 2009), fruta, vegetais, carne, leite, produtos fermentados de carne ou de vegetais (Suzzi et al., 2003), avelãs, café, bebidas alcoólicas (Önal, 2007), entre outros. Estes compostos são considerados como componentes tóxicos indesejáveis, estando por este motivo relacionados com a segurança alimentar e com a qualidade dos alimentos.

No que respeita à segurança alimentar, os produtos alimentares devem ser produzidos, transportados e armazenados sob escrupulosas condições higiénicas, por forma a evitar o crescimento de microrganismos e a consequente produção de teores elevados de determinadas aminas biogénicas que podem desencadear reacções adversas nos consumidores, tais como a tiramina, a histamina e, em menor grau, a 2-feniletilamina. Devido às suas propriedades vasoactivas, a tiramina e a 2-feniletilamina podem conduzir ao aumento da pressão arterial, podendo causar ainda dores de cabeça, suores, vómitos, entre outros efeitos (Vidal-Carou et al., 2009). Pessoas que estejam medicadas com fármacos inibidores da monoamino-oxidase (MAO) devem ter especial atenção com os alimentos consumidos, devido à possibilidade de ocorrência de um aumento dos efeitos vasoactivos provocados pela tiramina (Shalaby, 1996). A histamina pode provocar vasodilatação e subsequente hipotensão, problemas de pele (rubor e prurido), problemas gastrointestinais (diarreia, cólicas, vómitos) e neurológicos (dores de cabeça, tonturas),

entre outros (Vidal-Carou et al., 2009). A histamina tem sido implicada como agente causal em diversos surtos de intoxicação alimentar e pensa-se que pode ter uma toxicidade acrescida quando na presença de outras amins como a cadaverina, putrescina e tiramina (Shalaby, 1996). A agmatina, a espermina, a espermidina ou as amins terciárias podem ainda reagir com nitritos formando nitrosaminas carcinogénicas que constituem um potencial risco para a saúde humana (Shalaby, 1996).

A histamina é a única amina biogénica submetida a regulamentação jurídica em algumas espécies de peixes, sendo o limite máximo na Europa de 100mg/kg. No entanto não existe regulamentação para os enchidos (Latorre-Moratalla et al., 2008). Contudo, alguns autores consideram que a ingestão de 8-40mg, 40-100mg e superior a 100mg de histamina pode provocar um envenenamento ligeiro, intermédio e intenso, respectivamente (Önal, 2007).

Para além dos possíveis efeitos adversos para a saúde, a determinação do teor em amins biogénicas é também importante pela sua relação com a qualidade e higiene alimentar, uma vez que conteúdos elevados de determinadas amins podem indicar a utilização de matérias-primas de fraca qualidade ou contaminação devido a condições inapropriadas durante o processamento e/ou armazenamento dos alimentos.

Segundo Vidal-Carou e co-autores (2009) a qualidade higiénica e frescura de determinados alimentos pode ser determinada pelo índice de amins biogénicas (IAB), o qual pode ser calculado através da seguinte fórmula.

$$\text{(histamina + Putrescina + cadaverina)} / (1 + \text{espermina} + \text{espermidina}) \quad [1]$$

De uma forma geral, um valor de $\text{IAB} > 1$ indica uma baixa qualidade do produto, sendo que um valor de $\text{IAB} < 1$ indica o oposto, isto é, uma boa qualidade do produto alimentar em questão. Contudo, a aplicação do IAB em produtos fermentados é mais difícil, dado que a formação destes compostos pode não estar directa e exclusivamente associadas à qualidade das matérias-primas, mas sim devido à acção dos microrganismos que levam a cabo o processo de fermentação (Vidal-Carou et al., 2009).

1.3. Amins biogénicas em carne e em produtos cárneos

A generalidade dos alimentos ricos em proteínas podem acumular determinadas quantidades de amins biogénicas quando submetidos a condições que permitam o desenvolvimento da actividade bacteriana, como por exemplo, o armazenamento inadequado, a maturação e a fermentação. Diversos estudos realizados com carnes e produtos cárneos, alimentos com elevado teor proteico, têm demonstrado a presença de quantidades moderadas a elevadas destes compostos (Vidal-Carou et al., 2009). À excepção da espermina e da espermidina, consideradas amins biogénicas de origem

endógena, a principal origem de quantidades elevadas de aminas biogénicas nos alimentos em geral, e nas carnes em particular, é atribuída à acção das descarboxilases bacterianas.

No caso particular das carnes, o estudo do teor em aminas biogénicas adquire uma importância significativa uma vez que pode ser usado como indicador da perda de frescura bem como na monitorização da qualidade higiénica das matérias-primas usadas. Como indicador da perda de frescura, o estudo das aminas biogénicas, individuais ou em combinação, é muito relevante visto que o aumento significativo de aminas biogénicas ocorre antes do aparecimento dos sinais sensoriais de deterioração (Vidal-Carou et al., 2009). Por outro lado, os tratamentos térmicos aplicados pela indústria da carne aos produtos cárneos inactivam os microorganismos, contudo não reduzem o conteúdo de aminas biogénicas, porque estas são termorresistentes. Consequentemente, a acumulação de aminas biogénicas nos produtos cárneos, nomeadamente a tiramina, a putrescina e a cadaverina em concentrações acima dos níveis aceitáveis (100 a 200mg/kg para a tiramina, 50mg/kg para a putrescina e para a cadaverina) e até o aparecimento da histamina, pode ser considerado como resultado de más práticas de higiene, e portanto o seu estudo tem elevada importância na monitorização da qualidade higiénica das matérias-primas.

1.3.1. Ocorrência de aminas biogénicas em carne e em produtos cárneos

Existem vários factores que influenciam a produção de aminas biogénicas neste tipo de produtos, como o pH, a concentração de cloreto de sódio, o diâmetro dos produtos cárneos, o potencial redox, a temperatura de armazenamento, os aditivos (açúcar, sulfito de sódio e o nitrito de sódio), entre outros.

Carne fresca e produtos cárneos

Nas carnes recém-abatidas, a espermina e espermidina são as principais aminas detectadas, uma vez que, como referido anteriormente, são aminas de origem endógena (Patsias et al., 2006). Além de pequenas quantidades de putrescina que podem pontualmente ocorrer, as outras aminas são normalmente indetectáveis e só aparecem sob condições que permitam a actividade bacteriana. Em contraste com os produtos hortícolas, a carne e os produtos de origem animal contêm maiores quantidades de espermina do que espermidina, com um rácio de cerca de 10:1 entre elas. Segundo vários autores, o conteúdo de espermina e de espermidina pode variar amplamente na carne, estando descritas como frequentes concentrações de 15-50mg/kg para a espermina e 1-5mg/kg para a espermidina (Vidal-Carou et al., 2009). A espécie animal não parece ser determinante para a variação, pois as diferenças entre a carne de porco,

carne bovina e produtos avícolas, por exemplo, não são tão vastas quanto entre órgãos ou partes do mesmo animal ou outro animal da mesma espécie.

Produtos de carne cozida

Nos produtos à base de carne com tratamento térmico (enchidos com carne cozida, salsichas, fiambres, etc.), a espermina e a espermidina são as únicas aminas biogénicas usualmente detectadas (Vidal-Carou et al., 2009). Os níveis destas poliaminas nestes produtos são, em geral, ligeiramente inferiores aos da carne fresca, sendo este facto atribuído ao efeito da diluição produzida quando a carne magra é misturada com gordura e outros ingredientes incluídos na formulação do produto. Embora as poliaminas sejam consideradas resistentes ao calor, uma pequena redução destes compostos também tem sido relatada durante os tratamentos térmicos. O conteúdo das outras aminas biogénicas nestes produtos é muito mais variável do que o das poliaminas (idealmente <5mg/kg), (Vidal-Carou et al., 2009). Em geral, as concentrações de tiramina, histamina, e diaminas são muito baixas, com algumas excepções. Raramente a 2-feniletilamina e a triptamina são detectadas.

Produtos de carne curados

A fabricação destes produtos envolve grandes pedaços ou peças de todo o músculo sem picagem ou mistura. O sal comum é um ingrediente fundamental, contribuindo não só para a segurança do produto, mas também para o desenvolvimento das características organolépticas durante a maturação a temperaturas relativamente baixas. Embora o pH não diminua, sob estas condições o crescimento microbiano é fortemente limitado e, de uma forma geral, só as bactérias halófilas conseguem crescer (Suzzi et al., 2003). As leveduras e algumas bactérias ácido-lácticas também se podem desenvolver em menor quantidade. Consequentemente, o conteúdo de aminas biogénicas, como a tiramina, a histamina, a cadaverina e a putrescina neste tipo de produto é bastante baixo (com valores medianos de 2 a 80mg/kg), com apenas algumas excepções (Vidal-Carou et al., 2009). Não se conhece a ocorrência de quantidades significativas da 2-feniletilamina e da triptamina neste tipo de produtos.

O período de maturação é um factor crítico que determina o grau de acumulação das aminas biogénicas, especialmente a tiramina. Em contrapartida, uma grande formação de diaminas durante o fabrico, especialmente a cadaverina, tem sido relatada como dependente do tipo de maturação. Uma maturação rápida permite um crescimento maior das aminas biogénicas em comparação com uma maturação lenta. Estes resultados são atribuídos às altas temperaturas aplicadas durante a secagem/cura. Os fenómenos

proteolíticos que ocorrem durante o amadurecimento aumentam a concentração dos aminoácidos precursores e correlacionam-se com a formação das aminas biogénicas.

Produtos de carne fermentados

Dentro deste tipo de produtos, os enchidos e os queijos são os alimentos que registam uma quantidade maior em aminas biogénicas (Vidal-Carou et al., 2009). Relativamente aos enchidos, por vezes são encontrados produtos com teores elevados em aminas biogénicas, o que se justifica não só pelos seus teores elevados de proteína como principalmente pela actividade proteolítica que ocorre durante o período de maturação, a qual origina a libertação de aminoácidos que podem servir de precursores de aminas biogénicas pela acção das descarboxilases bacterianas.

A influência de vários factores físico-químicos tais como o pH, temperatura, potencial redox, concentração de cloreto de sódio e aditivos, na produção de aminas biogénicas em produtos fermentados, têm sido alvo de estudo em diversos trabalhos (Suzzi et al., 2003). A temperatura é um dos principais factores a ter em conta na produção deste tipo de alimentos. Segundo Vidal-Carou et al. (2009) quanto maior for a temperatura de armazenamento, mais rápida é a acumulação da cadaverina, putrescina, tiramina e histamina.

O sal comum é um ingrediente fundamental não só para a segurança do produto, mas também para o desenvolvimento das características organolépticas durante a maturação com temperaturas relativamente baixas (Vidal-Carou et al., 2009). À semelhança do que foi referido para os produtos curados, também nos enchidos fermentados a variação na quantidade de água e no rácio sal/água durante a fermentação e armazenamento dos produtos cárneos tem um papel importante na multiplicação microbiana, uma vez que reduz o seu crescimento (Suzzi et al., 2003). Alguns aditivos (açúcar, sulfito de sódio e o nitrito de sódio), normalmente adicionados a determinados enchidos, podem também afectar a produção de aminas biogénicas. Segundo Suzzi et al. (2003), o açúcar afecta de forma positiva a produção de aminas biogénicas dado que durante a fermentação e a maturação, as bactérias lácticas convertem a glicose a ácido láctico que é responsável pela diminuição do pH, reduzindo assim o crescimento dos microrganismos. Elevadas quantidades de histamina podem estar relacionadas com a inadequada diminuição do pH nos primeiros dias de maturação (Suzzi et al., 2003).

A adição de 500 a 1000 mg/kg de sulfito de sódio não reduz a produção da tiramina, apenas inibe a acumulação da cadaverina (Suzzi et al., 2003). A adição de 150mg/kg de nitrito de sódio a enchidos italianos diminuiu a acumulação de cadaverina e putrescina, mas por sua vez aumentou três vezes mais a concentração de histamina (Suzzi et al., 2003). A produção das aminas biogénicas também é afectada pelo diâmetro dos produtos, verificando-se uma menor concentração de sal e actividade da água superior

em produtos com maior diâmetro. Consequentemente, um maior diâmetro pode levar ao aumento das aminas biogénicas (principalmente de tiramina e putrescina) (Suzzi et al., 2003).

Para além de trabalhos pontuais realizados em produtos específicos de determinadas regiões ou países, no âmbito do projecto Europeu "Tradisausage" o teor em aminas biogénicas foi determinado em diversas amostras de enchidos fermentados (chouriça) produzidos por métodos tradicionais e provenientes da área mediterrânica (França, Espanha, Itália, Portugal e Grécia) e Eslováquia (Latorre-Moratalla et al., 2008). Neste estudo, verificou-se a existência de quantidades de aminas biogénicas variáveis de país para país. Contudo, a tiramina foi a amina biogénica encontrada em maior quantidade em todas as amostras, seguida da putrescina e da cadaverina (Latorre-Moratalla et al., 2008). Já em enchidos Dinamarqueses (Suzzi et al., 2003) verificou-se uma concentração superior de cadaverina em relação às outras aminas, ao passo que em enchidos do sul da Itália com diferentes diâmetros, verificou-se uma maior concentração de tiramina em todas as amostras, observando-se ainda que as amostras com maior diâmetro "Soppressata" continham concentrações mais elevadas de aminas biogénicas em relação à "Salsiccia" cujo diâmetro é menor (Parente et al., 2001; Suzzi et al., 2003). Nos enchidos Espanhóis artesanais e industriais a tiramina foi a amina biogénica com concentração mais elevada, seguida da putrescina (Miguélez-Arrizado et al., 2006), o mesmo se verificou nos enchidos artesanais Argentinos (Fadda et al., 2001), nos Belgas (norte e sul), Italianos e Noruegueses (Ansorena et al., 2002) e nos Russos (Suzzi et al., 2003). No que respeita ao estudo de enchidos tradicionais Portugueses, no painho de Portalegre verificou-se uma concentração superior de cadaverina em relação às outras aminas (Roseiro et al., 2006). Na chouriça e no salpicão de Vinhais verificou-se uma concentração superior de tiramina e de putrescina no caso das chourças e uma maior concentração de tiramina no caso do salpicão (Ferreira et al., 2007).

De todas as aminas biogénicas, a tiramina é normalmente a mais frequente e a mais abundante neste tipo de produtos, cujo valor médio descrito pela literatura é de 140mg/kg (Vidal-Carou et al., 2009). A maioria destes tipos de produtos mostram montantes relativamente reduzidos de diaminas, putrescina e cadaverina, porém, alguns podem acumular grandes montantes, que pode exceder o conteúdo da tiramina. Os valores médios descritos pela literatura para a putrescina e a cadaverina são 89mg/kg e 44mg/kg, respectivamente (Vidal-Carou et al., 2009). As outras aminas biogénicas também se detectam neste tipo de produtos onde a histamina, a 2-feniletilamina, a triptamina, a espermina e a espermidina podem apresentar os seguintes valores médios: 4mg/kg, 2mg/kg, 4mg/kg, 23mg/kg e 7mg/kg, respectivamente (Vidal-Carou et al., 2009).

1.4. Determinação de amins biogénicas em carne e em produtos cárneos

Vários procedimentos para a determinação das várias amins biogénicas em diferentes matrizes têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados, encontrando-se disponíveis na literatura. Analiticamente, a medição das amins biogénicas e poliaminas em alimentos não é um procedimento simples, principalmente pelos seguintes motivos:

- Diversidade das estruturas químicas das amins biogénicas (aromáticas, heterocíclicas e alifáticas);
- Ampla gama de concentrações de diferentes amins biogénicas que podem estar presentes no produto;
- Complexidade da amostra (elevado teor de proteínas e, muitas vezes, elevado teor de gordura).

Diversos autores consideram que o estudo analítico das amins biogénicas em produtos cárneos envolve essencialmente duas fases (Moret et al., 1996; Vidal-Carou et al., 2009):

- (1) a extracção das amins a partir da matriz (alimento sólido), que em alguns casos, inclui uma purificação ou limpeza do extracto bruto;
- (2) a determinação analítica das amins, que pode ser realizada por meio de uma variedade de abordagens, incluindo procedimentos enzimáticos, espectrofluorométricos e cromatográficos.

1.4.1. Extracção e purificação dos extractos

Nesta fase, as amins biogénicas presentes nas amostras sólidas, são extraídas para uma fase líquida e separadas dos compostos potencialmente interferentes. Esta fase é considerada uma etapa crucial para a precisão da metodologia, consistindo no factor mais decisivo para a recuperação analítica de cada amina. Embora alguns autores refiram a utilização de água (a quente ou à temperatura ambiente) na extracção de amins a partir de matrizes sólidas, os solventes mais utilizados são as soluções ácidas, como o ácido clorídrico (por exemplo a 0,1M) (Vidal-Carou et al., 2009), ácido tricloroacético (por exemplo a 5-10%) (Patsias et al., 2006; Balamatsia et al., 2006; Ruiz-Capillas et al., 2007; Ansorena et al., 2002; Komprda et al., 2004), e o ácido perclórico (por exemplo a 0,4-0,6M) (Vinc et al., 2002; Hernández-Jover et al., 1996; Roseiro et al., 2006; Gençlelep et al., 2007; Min et al., 2007; Latorre-Moratalla et al., 2008; Gençlelep et al., 2008; Bover-Cid et al., 1999; Virgili et al., 2007; Ansorena et al., 2002) bem como solventes orgânicos tais como o butanol, butanol/clorofórmio, metanol, acetona (Ansorena et al., 2002), acetonitrilo/ácido perclórico, diclorometano/ácido perclórico ou ácido metanosulfónico (Önal, 2007). No caso mais frequente, em que a

extracção se realiza com soluções ácidas, a selectividade e a recuperação são influenciadas pelo tipo de ácido utilizado. Apesar de vários estudos compararem a capacidade de extracção de distintos ácidos, os resultados obtidos nem sempre são concordantes ou conclusivos. No caso dos produtos cárneos, devido à turbidez e à ocorrência de substâncias interferentes, o ácido clorídrico não é uma escolha adequada, sendo recomendados o ácido perclórico ou o ácido tricloroacético pela sua elevada capacidade na precipitação das proteínas (Vidal-Carou et al., 2009). Dependendo da técnica analítica aplicada na determinação das aminas biogénicas, poderá ser necessário introduzir um passo prévio de limpeza/purificação do extracto. Várias abordagens têm sido propostas para purificar os extractos brutos, incluindo a extracção em fase sólida com alumina ou resina de troca iónica. A extracção líquido-líquido com solventes orgânicos é também frequentemente aplicada. Neste caso, o extracto bruto é saturado com um sal, ajustado a um pH alcalino, e particionado com um solvente orgânico que consiga extrair selectivamente as aminas, deixando os aminoácidos livres na fase aquosa. Porque o pH óptimo para a extracção varia entre as aminas, um rigoroso controlo deste parâmetro é necessário para se obterem recuperações e reprodutibilidade satisfatórias. Contudo, a etapa de limpeza aumenta o tempo de análise e introduz um factor de incerteza e variabilidade como resultado do manuseamento da amostra (Vidal-Carou et al., 2009). A utilização de um padrão interno como o 1,7-diaminoheptano (Lorenzo et al., 2007; Roseiro et al., 2006; Gençcelep et al., 2007; Min et al., 2007; Gençcelep et al., 2008; Ferreira et al., 2007; Parente et al., 2001; Ansorena et al., 2002; Komprda et al., 2004), o 1,8-diaminooctano (Ansorena et al., 2002) ou a benzilamina (Vidal-Carou et al., 2009) pode ajudar a resolver essa limitação.

1.4.2. Metodologias analíticas para a detecção e quantificação de aminas biogénicas

Até à presente data, vários métodos têm sido desenvolvidos para a análise das aminas biogénicas, incluindo a cromatografia em camada fina, a cromatografia gasosa, a electroforese capilar, a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Önal, 2007), a conductimetria, a detecção amperométrica/electroquímica e a ressonância magnética nuclear (com ou sem separação cromatográfica prévia) (Gosetti et al., 2007). Pela sua elevada resolução, sensibilidade e versatilidade, os procedimentos cromatográficos são os métodos mais utilizados (Vidal-Carou et al., 2009). A cromatografia em camada fina é um método simples, que não requer um equipamento especial, mas a análise é demorada e os resultados são imprecisos. A cromatografia gasosa não é frequentemente aplicada neste tipo de análises. Pelo contrário, a utilização de HPLC, com colunas de troca iónica ou de fase reversa, é o método mais referido na literatura (Önal, 2007).

A detecção das aminas biogénicas é geralmente feita recorrendo a detectores UV-Vis, de díodos (DAD) ou de fluorescência. Contudo, nestes casos é necessário proceder à sua derivatização (pré ou pós-coluna) devido aos baixos coeficientes de absorção no UV-Vis, especialmente no caso das aminas de natureza alifática (Vidal-Carou et al., 2009).

A derivatização química destes compostos pode ser realizada com uma variedade de reagentes. Os mais frequentemente utilizados são o cloreto de dansilo (cloreto de 5-dimetilamino-1-naftaleno-sulfonilo [DnCl]), que forma compostos estáveis após a reacção quer com aminas primárias quer secundárias, e *o*-ftaldialdeído (OPA), que reage rapidamente (aproximadamente 30 seg) com as aminas primárias, na presença de um agente redutor como o 2-mercaptoetanol (ME) (Önal, 2007). A Figura 1 mostra a derivatização das aminas biogénicas com o cloreto de dansilo e com o OPA. No caso específico da determinação de aminas biogénicas em carnes, alguns autores referem a utilização do cloreto de dabsilo (Bockhardt et al., 1996; Castillo e Castells, 2001). Outros reagentes de derivatização têm sido descritos e utilizados em vários trabalhos, tais como fluorescamina, isotiocianato de fluoresceína (FITC), fenilisotiocanato (PITC), 6 - aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato (ACCQ), cloreto de 2-naftiloxicarbonilo (NOC-Cl), cloreto de benzoílo, ninidrina (Vidal-Carou et al., 2009), 9-fluorenilmetil cloroformato e 2,3-naftaleno dicarboxaldeído (Önal, 2007).

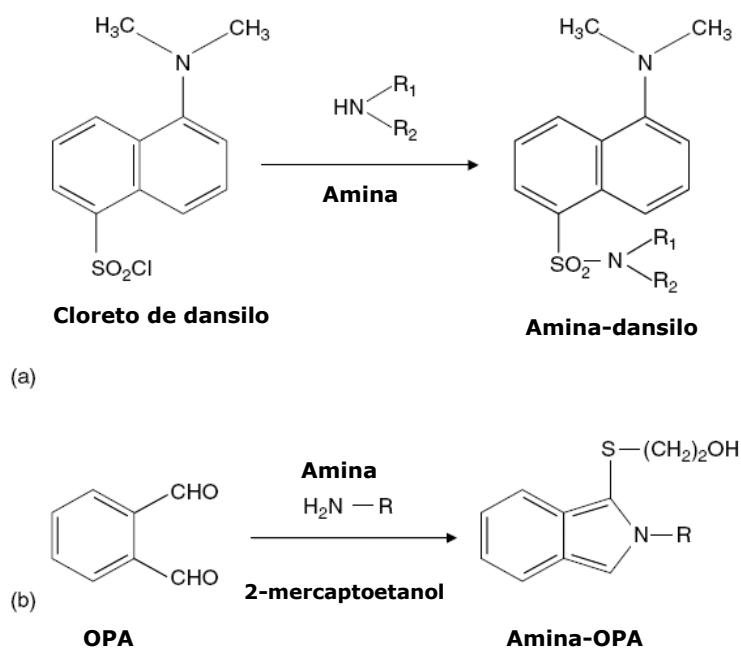


Figura 1 – Representação das reacções de derivatização das aminas biogénicas com o cloreto de dansilo (a) e com o *o*-ftaldialdeído (b). [Fonte: Vidal-Carou et al., 2009]

Alguns autores sugerem que a utilização de OPA como derivatizante, em vez de DnCl ou fluorescamina, pode ser vantajoso devido à maior selectividade para as aminas primárias e ao aumento da sensibilidade do método. No entanto, a estabilidade dos derivados OPA-

amina é baixa, sendo recomendada a derivatização pós-coluna ou pré-coluna realizada imediatamente antes da análise por HPLC (Vidal-Carou et al., 2009). Por outro lado, alguns autores referem que o OPA não seria adequado para a determinação das poliaminas naturais, espermina e espermidina, uma vez que este derivatizante reage preferencialmente com grupos amina primários. No entanto, vários autores têm descrito metodologias baseadas em derivatização com OPA que permitem a medição exacta dessas duas poliaminas. Tal poder-se-á dever ao facto de que também estas poliaminas apresentam agrupamentos amino primários para além de aminas secundárias e, portanto, poderão reagir com o reagente OPA-ME como as outras aminas biogénicas. No entanto, a maioria dos trabalhos publicados utiliza o cloreto de dansilo como derivatizante (pré-coluna). De forma idêntica ao que acontece com a fluorescamina, a derivatização com DnCl resulta frequentemente em vários subprodutos interferentes que devem ser removidos antes da análise cromatográfica, para evitar a co-eluição com as aminas biogénicas. Para tal, é frequente a adição de amónia ou prolina, com a função de consumir o excesso de reagente de derivatização, de forma a estabilizar o extracto. Apesar de existirem vários trabalhos que reportam o teor de aminas biogénicas em carnes e produtos cárneos, poucos estudos têm comparado o desempenho e a concordância entre os diversos métodos analíticos descritos na bibliografia e utilizados na determinação das aminas biogénicas nestes produtos alimentares. Na Tabela 2 podem ser consultadas as condições utilizadas em diversos trabalhos disponíveis na bibliografia relativos à determinação destes compostos em carnes ou produtos cárneos. Como se pode verificar, existem muitas variações, por exemplo no que respeita ao método extractivo, ao derivatizante utilizado, ao método de detecção e à utilização, ou não, de padrão interno.

Tabela 2 – Trabalhos realizados no estudo das aminas biogénicas em carne e em produtos cárneos.

Amostra	Aminas biogénicas	Fase estacionária	Fase móvel	Padrão Interno	Detector	Derivatização	Extracção da amostra	Referência
Enchidos	TR; SE; TI; ED; EM; CA; HI; PU; FE ^a	Spherisorb ODS2, 5µm, 125x4mm T _{col} = 40°C	<i>Eluente A:</i> Acetato de amónio 0,1M <i>Eluente B:</i> Acetonitrilo	DAH ^b	UV-Vis 254nm	DnCl	Ácido perclórico (0,4M)	Eerola et al., 1993
Enchidos	TR, FE, PU, CA, HI, ED, EM, SE	Spherisorb ODS2, 10x4mm T _{col} = 50°C	<i>Eluente A:</i> Dihidrogenofosfato de sódio 9mM, dimetilformamida 4%, trietilamina 0,1-0,2% ajustar o pH a 6,55 com ácido fosfórico <i>Eluente B:</i> Acetonitrilo/água (80:20, v/v)	Norleucina e norvalina	436nm	Cloreto de dabsilo	TCA	Krause et al., 1995
Salame Vinho Queijo	TR, FE, PU, CA, HI, SE, TI, ED, EM, MET	Spherisorb ODS2, 4,6 x 150mm, 3µm T _{col} = 50°C	<i>Eluente A:</i> Dihidrogenofosfato de sódio 9mM, dimetilformamida 4%, trietilamina 0,1-0,2% ajustar o pH a 6,55 com ácido fosfórico <i>Eluente B:</i> 80% Acetonitrilo/10% água/ 10% terc- butilmetil éter	DAH e DAO ^c	436nm	Cloreto de dabsilo	TCA (5%)	Bockhardt et al., 1996
Carnes frescas: porco e bovina Presunto cozido e enchidos	HI, TI, FE, SE, TR, OC, DO, CA, PU, AG, EM, ED	Waters Nova-Pack C18 (3,9 x150mm; 4µm)	<i>Eluente A:</i> Acetato de sódio 0,1M com Octanosulfonato de sódio 10mM (pH 5,2) <i>Eluente B:</i> Solvente B e acetonitrilo; solvente B: Acetato de sódio 0,2M com octanosulfonato de sódio 10mM (pH 4,5) Fluxo=1ml/min	-----	FL Excitação: 340nm Emissão: 445nm	OPA-ME	Ácido perclórico (0,6N)	Hernandez-Jover et al., 1996
Carne	TR, FE, PU, CA, HI, SE, TI, ED, EM	SBC – ODS 150 x 2,5mm, 5µm T _{col} = 30°C	<i>Eluente A:</i> Metanol/ Acetonitrilo (1,6:1, v/v) <i>Eluente B:</i> 2% Trietilamina em água (v/v)	-----	450nm	Cloreto de dabsilo	TCA (5%)	Castillo et al., 2001
Enchidos artesanais Argentinos	TI, HI	Coluna C18 Novapack, 60 Å, 4µm	<i>Eluente A:</i> Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (0,1M) / metanol/THF <i>Eluente B:</i> metanol/ Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄ Fluxo=1ml/min	-----	UV 340nm	OPA	-----	Fadda et al., 2001
Enchidos Belgas(norte/sul), Italianos; Noruegueses	TR, FE, PU, CA, HI, TI, ED, EM	RP	-----	DAH DAO	UV 254nm	DnCl	Ácido Perclórico (0,4M) TCA (5%)	Ansorena et al., 2002
Salame e presunto	HI, TI, CA, PU,	Coluna LiChrospher RP 18 (250x4mm, 5µm)	<i>Eluente A:</i> Acetato de sódio 20mM, trietilamina 0.01% (pH 7,2), Tetrahydrofurano 0.3% <i>Eluente B:</i> Acetato de sódio 100mM (pH 7,2), acetonitrilo 40%, Metanol 40% Fluxo= 0,9ml/min	-----	DAD	OPA	TCA (5%)	Lange et al., 2002
Carnes: bovino e frango	TR, SE, PU, CA, TI, ED, EM ^a	Supelcosil LC-18 (250x4,6mm ² ;5µm) T _{col} = 40°C	<i>Eluente A:</i> Acetato de amónia 0,1M <i>Eluente B:</i> Acetonitrilo Fluxo =1,2ml/min	-----	UV-Vis 254nm	DnCl	Ácido perclórico (0,4M)	Vinci et al., 2002
Carne fresca de porco e enchidos	TI, HI, TR, FE, SE, PU, CA, AG, ED, EM	RP ião-par	Ácido octanosulfónico	-----	FL	OPA-ME	-----	Bover-Cid et al., 2003

Tabela 2 – Trabalhos realizados no estudo das aminas biogénicas em carne e em produtos cárneos (continuação).

<i>Amostra</i>	<i>Aminas biogénicas</i>	<i>Fase estacionária</i>	<i>Fase móvel</i>	<i>Padrão interno</i>	<i>Detector</i>	<i>Derivatização</i>	<i>Extracção da amostra</i>	<i>Ref.</i>
Carne de frango fresca	PU, CA, EM, ED, TI, HI	-----	Solução aquosa de SDS 0,4M tamponada com uma solução de fosfato 0,02M Acetonitrilo Fluxo=1,1ml/min	-----	UV-Vis 254nm	Cloreto de benzoílo	TCA 6% (v/v)	Balamatsia et al., 2006
Enchidos Espanhóis artesanais/ industriais	TI, PU, CA, HI, EM, ED	RP Nova-Pack C18	Ácido octanosulfónico	-----	FL	OPA	Ácido perclórico (0.6M)	Miguélez-Arrizado et al., 2006
Carne de frango pré-cozinhada	PU, CA, EM, ED, TI, HI	LiChrospher 100 RP-18 (244mm x 4,4mm) 5 µm	Solução aquosa de SDS 0,4M tamponada com uma solução de fosfato 0,02M Acetonitrilo Fluxo=1,1ml/min	-----	UV-Vis 254nm	Cloreto de benzoílo	TCA 6% (v/v)	Patsias et al., 2006
Enchidos	CA, EM, ED, PU, TI, HI	Coluna Spherisorb ODS2 150A; (150 x 4,60mm) T _{col} = 40°C	<i>Eluente A:</i> Acetato de amónio 0,1M <i>Eluente B:</i> Acetonitrilo Fluxo=1ml/min	DAH	DAD 254nm	DnCl	Ácido perclórico (0.4M)	Gençcelep et al., 2007
Presunto espanhol	AG, TR, FE, PU, CA, HI, TI, ED, EM	Coluna RP C18 Kromasil 100 (25cm, 4mm) T _{col} = 40±1°C	<i>Eluente A:</i> Acetato de amónia 0,1M <i>Eluente B:</i> Acetonitrilo	DAH	254nm	-----	-----	Lorenzo et al., 2007
Lombo de porco e carne Moída	PU, CA, HI, SE, TI, ED, EM	Coluna Spherisorb ODS2(4,6 x150mm; 5µm) T _{col} = 40°C	<i>Eluente A:</i> Acetato de amónia 0,1M <i>Eluente B:</i> Acetonitrilo Fluxo=1ml/min	DAH	DAD/FL Excitação: 254nm Emissão: 550nm	DnCl	Ácido perclórico (0.4M)	Min et al., 2007
Enchidos	CA, HI, PU, TI	Coluna RP C18 (Waters Symmetry; (3,5µm;4,6x150mm)	Metanol; Acetonitrilo; Ácido acético	-----	UV-Vis 254nm	DnCl	-----	Pircher et al., 2007
Enchidos	TR, FE, PU, CA, HI, TR, ED, EM	Coluna Spherisorb ODS2 150A (150 x 4,60mm) T _{col} = 40°C	<i>Eluente A:</i> Acetato de amónia 0,1M <i>Eluente B:</i> Acetonitrilo Fluxo=1ml/min	DAH	DAD 254nm	DnCl	Ácido perclórico (0.4M)	Gençcelep et al., 2008
Enchidos tradicionais da França / Espanha / Itália/Portugal/ Grécia/ Eslováquia	TI, PU, CA, HI, FE, TR	RP C18	Ácido octanosulfónico	-----	FL Excitação: 340nm Emissão: 445nm	OPA	Ácido perclórico (0,6N)	Latorre-Moratalla et al., 2008

^a TR – Triptamina; SE – Serotonina; TI – Tiramina; ED – Espermidina; EM – Espermina; CA – Cadaverina; HI – Histamina; PU – Putrescina; FE – 2-feniletilamina; OC – Octopamina; DO – Dopamina; AG – Agmatina; ^b DAH: 1,7-diaminoheptano; ^c DAO: 1,8-diaminoctano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

As amostras estudadas foram adquiridas em grandes superfícies comerciais. Das amostras seleccionadas, algumas apresentavam-se embaladas em atmosfera protectora e algumas tinham adição de conservantes.

Os chouriços analisados foram cortados ao meio, congelando metade. A outra metade foi triturada depois de ter sido retirada a película exterior, armazenando-se o chouriço picado em frascos de plástico rolhados. Após homogeneização procedeu-se à congelação da amostra (-20°C) em frascos devidamente rotulados, recolhendo-se uma porção da amostra sempre que necessária a sua análise.

Na Tabela 3 encontram-se registadas as características de cada amostra.

Tabela 3 – Características dos enchidos em estudo.

Produto	Região	Marca	Rótulo
Chouriço Aldeão (C1)	Batalha	Marca Branca (Fabricante 1/hipermercado)	Carne e gordura de porco, sal, alho, vinho, massa de pimentão, mistura de especiarias em proporção variável, emulsionante E452, antioxidante E-301, conservantes E-250 e E252. Acondicionado em atmosfera protectora.
Chouriço de Carne (C2)	Cabeceiras de Basto	Marca Branca (Fabricante 1/hipermercado)	Carne, entremeada de porco, vinho, sal, alho, pimenta, emulsionante E-450, conservante E-250. Acondicionado em atmosfera protectora.
Chouriço de Porco Preto (C3)	Barrancos	Produto de Selecção (Fabricante 1/hipermercado)	Carne e gordura de suíno alentejano (porco preto), sal, alho, massa de pimentão. Acondicionado em atmosfera protectora.
Linguiça Transmontana (C4)	Oliveira do Hospital	Produto de Marca Original (Fabricante 2)	Carne de porco, vinho, sal, alho, açúcares, emulsionante E-450 e E-451, antioxidantes E-316 e E-331, conservante E-250 e E-252, especiarias.
Chouriço (C5)	Portalegre indicação geográfica protegida (IGP)	Produto de Selecção (fabricante 1/hipermercado)	Carne magra e gordura de suíno alentejano, pimentão da horta, alho, água, sal e pimenta branca. Acondicionado em atmosfera protectora
Chouriço de Carne (C6)	Beja	Marca Branca (Fabricante 1/hipermercado)	Carne e gordura de porco, massa de pimentão, alho, sal, pimenta branca, noz-moscada, tripa de porco, emulsionantes E-455, E-450, e E-450, antioxidantes E-301 e E-331, conservantes E-250 e E-252. Acondicionado em atmosfera protectora modificada.
Chouriço de Carne (C7)	Alentejo	Produto de Marca Original (Fabricante 3)	Carne e gordura de porco, massa de pimentão, alho, sal, emulsionantes E-450 e E-451, antioxidantes E-300 e E-301, conservantes E-250 e E-251, tripa natural de porco.
Chouriço de Carne (C8)	Barrancos	Produto de Marca Original (Fabricante 4)	Carne de porco de raça alentejana, sal, alho, pimentão da horta, pimenta agri-doce, oleoresina de pimentão, conservantes E-250 e E-252.

2.2. Reagentes e padrões

Para este estudo foram usados padrões na forma de sais hidrolóricos sendo a triptamina, β -feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina e a tiramina sido fornecidas pela Sigma (St. Louis, MO, USA), a espermidina e a espermina fornecidas pela Aldrich (Milwaukee, WI, USA) e o padrão interno, 1,7-diaminoheptano, fornecido pela Fluka (Buchs, Switzerland). As características das substâncias referidas apresentam-se na Tabela 4.

Usou-se como derivatizantes o cloreto de dansilo (5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonil cloreto) e o cloreto de dabsilo (9-fluorenilmetil cloroformato e 2,3-naftaleno dicarboxaldeído), ambos fornecidos pela Sigma.

Tabela 4 – Características das substâncias padrão utilizadas

<i>Nome dos padrões</i>	<i>Grau de pureza do sal (%)</i>	<i>CAS^a</i>	<i>Fórmula estrutural do sal</i>	<i>Mw_{sal}^b (g/mol)</i>	<i>Mw_{amina} (g/mol)</i>
Triptamina	99	343-94-2	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ .HCl	196,68	160,24
β -feniletilamina	98	156-28-5	C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂ NH ₂ .HCl	157,64	121,20
Putrescina	98	333-93-7	NH ₂ (CH ₂) ₄ NH ₂ .2HCl	161,00	88,18
Cadaverina	98	1476-39-7	NH ₂ (CH ₂) ₅ NH ₂ .2HCl	175,10	102,21
Histamina	99	56-92-8	C ₅ H ₉ N ₃ .2HCl	184,07	111,17
1,7-diaminoheptano (PI ^c)	95	646-19-5	NH ₂ (CH ₂) ₇ NH ₂		130,23
Tiramina	98	60-19-5	HOC ₆ H ₄ CH ₂ CH ₂ NH ₂ .HCl	173,64	137,20
Espermidina	98	334-50-9	NH ₂ (CH ₂) ₃ NH(CH ₂) ₄ NH ₂ .3HCl	254,63	145,29
Espermina	98	306-67-2	C ₁₀ H ₂₆ N ₄ .4HCl	348,18	202,40

^a CAS: Chemical Abstracts service; ^b Mw: massa molar; ^c PI: padrão interno

Todas as substâncias padrão foram guardadas segundo indicação do fabricante até ao momento da sua utilização, tendo-se colocado a β -feniletilamina, histamina, 1,7-diaminoheptano no frigorífico a 4°C e as restantes no excicador.

Usou-se metanol e acetonitrilo com grau Lichrosolv fornecidos pela Merck e Romil – Sps, respectivamente. A água ultrapura usada neste estudo provinha de um sistema de purificação de água Seralpur PRO 90 CN e Seradest LFM 20.

Os restantes reagentes apresentavam grau de pureza p.a. e eram da marca Merck ou Fluka.

2.3. Preparação de soluções

Foram preparadas duas soluções mãe para cada padrão, uma para cada estudo com os derivatizantes testados, nomeadamente o cloreto de dansilo e o cloreto de dabsilo.

Estas soluções foram feitas dissolvendo as quantidades que se encontram registadas na tabela seguinte de sal hidroclicórico de cada amina em 10ml de água ou de HCl (0,1mol/l), para o estudo efectuado com o cloreto de dansilo ou com o cloreto de dabsilo, respectivamente. As soluções foram guardadas no frigorífico a 4°C até ao momento da sua utilização. Na Tabela 5 encontram-se registadas as massas usadas e as concentrações de cada composto.

Tabela 5 – Registo das massas pesadas de cada composto e da concentração da amina livre nas soluções mãe.

Amina	Cloreto de dansilo		Cloreto de dabsilo	
	m_{sal} (mg)	$C_{amina\ livre}$ (mg/ml)	m_{sal} (mg)	$C_{amina\ livre}$ (mg/ml)
Triptamina	12,5	1,01	50,4	4,07
β-feniletilamina	14,5	1,09	67,6	5,09
Putrescina	18,2	0,98	75,2	4,04
Cadaverina	18,7	1,07	72,0	4,12
Histamina	17,0	1,02	67,2	4,02
1,7-diaminoheptano (PI)	13,6	1,29	43,0	4,09
Tiramina	12,6	0,98	54,0	4,19
Espermidina	24,7	1,38	72,8	4,08
Espermina	26,6	1,52	72,0	4,10

Prepararam-se duas soluções padrão de trabalho a partir das soluções mãe com concentração de 100µg/ml e 2,5µmol/ml para o estudo com o cloreto de dansilo e com o cloreto de dabsilo, respectivamente. À semelhança da preparação das soluções-mãe dos padrões, a solução padrão de trabalho usada no estudo com o cloreto de dansilo foi feita com água, já a solução padrão de trabalho usada no estudo com o cloreto de dabsilo foi feita com HCl, à qual se adicionava previamente 0,02g de TDPA (ácido 3,3-tiodipropiónico) como antioxidante, de acordo com o usualmente descrito na literatura. Esta solução foi colocada num banho de ultra-sons (Ultrasonic Cleaner FUNGILAB) até à total dissolução do TDPA.

A solução dos derivatizantes – cloreto de dansilo e cloreto de dabsilo – eram preparadas diariamente em acetona, com uma concentração de 10mg/ml e 2mg/ml, respectivamente, sendo a dissolução facilitada pela utilização de ultra-sons e a eliminação de partículas insolúveis realizada por filtração em papel.

A solução tampão de bicarbonato de sódio, necessária para o ajuste do pH para a derivatização, foi preparada com uma concentração de 0,15mol/ml. Esta solução foi obtida dissolvendo 630mg de bicarbonato de sódio em 40ml de água, ajustando-se o pH a 8,6 com solução de hidróxido de sódio e perfazendo o volume a 50ml com água. Esta solução foi guardada a 4°C.

2.4. Processo extractivo

Para extracção das aminas das amostras de enchidos, pesou-se rigorosamente uma toma com aproximadamente 1 g, à qual se adicionou 0,02g de TDPA, 200 μ l da solução mãe de PI (4,085 mg/ml) e 5ml de ácido tricloroacético (TCA) a 5% (m/v).

Colocaram-se os tubos num banho de ultra-sons até dissolver o TDPA. Seguidamente, para favorecer a hidratação da amostra de carne, agitou-se a mistura durante 10 min (Nutating Mixer, VWR International). Levou-se novamente a um banho de ultra-sons durante 15min e procedeu-se à centrifugação da mistura durante 10min a 5000rpm (Heraeus Sepatech, Labofuge Ae). O sobrenadante foi filtrado através de papel de filtro para um novo tubo, e o resíduo sólido foi novamente extraído com 5ml de TCA a 5%.

Repetiu-se o processo de extracção levando novamente ao banho de ultra-sons (15 min) seguido de centrifugação (10min, 5000rpm). Tirou-se o sobrenadante, filtrou-se e juntou-se ao filtrado anterior. Finalmente, o filtro foi lavado com TCA a 5% até se obter 10ml de extracto. Todos os extractos foram armazenados a -20°C.

Antes de derivatizar os extractos, estes eram agitados no vórtex (VWR International) e centrifugados (BIOFUGE pico, Heraeus Instruments) em *eppendorfs* durante 5min a 13000rpm.

2.5. Condições de derivatização

2.5.1. Cloreto de dansilo

A 1ml de solução padrão de trabalho ou extracto de amostra adicionou-se 200 μ l de solução de hidróxido de sódio (2N), 300 μ l de uma solução saturada de bicarbonato de sódio e 2ml de solução de cloreto de dansilo (10mg/ml). Seguidamente, colocou-se a mistura em banho de água a 40°C durante 45min, ao abrigo da luz. Após este tempo, para consumir o excesso de cloreto de dansilo, adicionou-se 100 μ l de amónia. Passados 30min ajustou-se o volume a 5ml com metanol. Centrifugou-se 5min a 13000rpm. Passaram-se as soluções para frascos de vidro e guardaram-se a -20°C até ao momento da injeção.

2.5.2. Cloreto de dabsilo

A 20 μ l do extracto (centrifugado) ou de solução padrão de trabalho adicionou-se 180 μ l da solução tampão de bicarbonato. A mistura foi homogeneizada em vortex e adicionou-se 200 μ l de solução de cloreto de dabsilo a cada frasco de vidro (Supelco). Estes foram depois agitados e colocados na estufa durante 20min a 70°C para permitir que ocorra a reacção de derivatização. Já dentro da estufa os frascos eram agitados no 1º e no 16º minuto. Após este tempo, os derivatizados foram colocados no gelo durante 5min para parar a reacção. Seguidamente, adicionou-se 1ml de tolueno a cada frasco, agitou-se e

centrifugou-se durante 1,5min a 5000 rpm. Tirou-se 900 μ l de sobrenadante para um novo frasco e procedeu-se à evaporação do solvente em corrente de azoto (modelo Pierce 18790, Reacti-Therm) até à secura total. Retomou-se o volume com 200 μ l de acetona, agitou-se, passou-se para *ependorfs* e centrifugou-se o derivatizado durante 5min a 13000rpm. Transferiu-se a solução para um novo frasco de vidro (2ml) e guardou-se a -20°C até ao momento da injeção.

2.6. Análise cromatográfica

2.6.1. Sistema cromatográfico

Utilizou-se um cromatógrafo líquido Jasco, equipado com uma bomba quaternária modelo PU-2089 Plus, injetor manual com "loop" de 10 μ l, ou em alternativa um injetor automático Jasco modelo AS-950, e um detector UV-Vis modelo UV-970.

A separação das aminas foi realizada numa coluna cromatográfica monolítica de fase reversa Chromolith® Performance RP-18 endcapped (10cmx3mm, 2 μ m macropore, 13nm mesopore) (Merck) ou, em alternativa, numa coluna Discovery® C18 (5cmx3mm, 5 μ m) (Supelco), com pré-coluna C18 (Phenomenex). A recolha e tratamento dos dados cromatográficos foi efectuada utilizando o software Borwin versão 1.5 (JMBS, França).

Na Figura 2 encontra-se ilustrado o sistema cromatográfico utilizado.



Figura 2 – Equipamento de HPLC utilizado neste trabalho.

2.6.2. Condições cromatográficas

Ao longo do estudo, foram experimentados diferentes eluentes e gradientes de forma a obter uma melhor resolução cromatográfica no mais curto espaço de tempo, com vista ao consumo da menor quantidade possível de solventes. Os gradientes escolhidos e usados no estudo com o cloreto de dansilo e com o cloreto de dabsilo encontram-se descritos na Tabela 6.

Os eluentes usados na fase móvel para o estudo com o cloreto de dansilo e com o cloreto de dabsilo foram os seguintes:

- *Cloreto de dansilo:*

Eluente A – Metanol

Eluente B – Acetato de amónio (0,1M) / Metanol (50:50, v/v)

- *Cloreto de dabsilo:*

Eluente A – Acetonitrilo/Metanol (50:50, v/v)

Eluente B – 60% solução B (solução B: 9mM de dihidrogenofosfato de sódio, 4% de dimetilformamida e 0,15% de trietilamina; acertou-se o pH a 6,55 com ácido fosfórico) e 40% do eluente A.

Todos os eluentes foram desgaseificados num banho de ultra-sons durante 10min antes de serem usados no HPLC. O eluente B em ambos os estudos foi previamente filtrado.

Tabela 6 – Programa de eluição usado nas análises efectuadas com o cloreto de dansilo e o cloreto de dabsilo.

<i>Cloreto de dansilo</i>			<i>Cloreto de dabsilo</i>		
Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	10	90	0	15	85
3	28	72	1	40	60
8	90	10	3	60	40
9	10	90	4	70	30
11	10	90	5	100	0
			6,2	100	0
			6,5	15	85
			9	15	85

Ambos os estudos foram feitos com fluxo de 1ml/min. Para o estudo com o cloreto de dansilo e o cloreto de dabsilo foi usado um detector UV-Vis (modelo UV-970, Jasco) programado a 254nm e a 436nm, respectivamente. As amins em estudo foram identificadas por comparação dos tempos de retenção (t_R) com os obtidos para as substâncias padrão. Para tal foram feitas várias derivatizações das substâncias padrão de forma individualizada, as quais foram analisadas individualmente e os tempos de retenção registados. Para confirmação das substâncias nas amostras, procedeu-se à suplementação das amostras com padrões individuais ("spiking"). A quantificação dos diferentes compostos foi feita com base no sinal obtido pelo detector UV-Vis, utilizando o método do padrão interno.

3. Resultados e discussão

Como referido anteriormente, a cromatografia em fase reversa é a mais utilizada na análise de amins biogénicas por HPLC. A cromatografia líquida de alta resolução é uma técnica que utiliza uma fase móvel líquida e uma fase estacionária constituída por pequenas partículas (na ordem de grandeza de poucos *microns*). De forma a obter uma elevada eficiência da separação, a fase móvel é sujeita a elevadas pressões (Barreiro, 2003). Neste trabalho, foram estudados, entre outros, dois parâmetros de elevada importância em cromatografia líquida, nomeadamente a fase estacionária e a fase móvel utilizadas. No que respeita o primeiro, testaram-se duas colunas diferentes, uma coluna tradicional de sílica com partículas de 5 μ m, contudo de pequena dimensão (5cmx3mm i.d.) versus uma coluna recente no mercado, a Chromolith® Performance RP-18 endcapped (Merck), que consiste numa coluna de fase reversa – C18 que tem como característica ser feita de uma única “peça” de sílica gel polimérica de elevada pureza. As colunas tradicionais apresentam frequentemente um número de pratos teóricos limitados, sendo que as tentativas de aumentar o número de pratos teóricos através da redução do tamanho das partículas, resulta em pressões inaceitáveis. Segundo os fabricantes, a utilização de colunas monolíticas permite alcançar uma separação elevada com uma grande redução da pressão operacional. A coluna escolhida, em particular, é altamente porosa com uma revolucionária estrutura de poros bimodais, proporcionando uma combinação única entre macroporos e mesoporos. Os macroporos, com tamanho médio de 2 μ m, permitem o rápido escoamento da fase móvel a baixa pressão. Os mesoporos formam uma fina estrutura porosa (tamanho médio do poro é de 13 nm) criando uma grande superfície uniforme em que ocorre adsorção, permitindo assim um elevado desempenho na separação cromatográfica. Segundo o fabricante, esta coluna permite obter menores tempos de retenção, para além de permitir trabalhar com fluxos muito superiores (até 9ml/min) aos tradicionalmente usados em colunas de fase reversa. Outra vantagem destas colunas é o facto de apresentarem uma resposta muito rápida a mudanças de fluxo do eluente, permitindo que estas sejam realizadas durante a análise cromatográfica, o que possibilita, por exemplo, aumentar a definição de um pico em particular ou diminuir o tempo de corrida quando um dos compostos elui muito tempo após outros compostos presentes na amostra.

No que respeita o segundo parâmetro referido, a grande maioria dos métodos publicados para análise de amins biogénicas utiliza o acetonitrilo como um dos solventes da fase móvel. Devido à crise internacional, em que o acetonitrilo apresenta actualmente um preço demasiado elevado, não sendo economicamente viável a sua utilização em

quantidades elevadas tentou encontrar-se uma alternativa a este solvente, se possível que fosse também ambientalmente mais amigável.

3.1. Optimização das condições analíticas

De forma a obter um método sensível e reprodutível para a detecção e quantificação das 8 aminas biogénicas em estudo, procedeu-se à optimização de vários parâmetros, nomeadamente de eluentes, gradiente, derivatizante e reacção de derivatização (relação temperatura/tempo de derivatização e relação concentração de derivatizante/tempo de derivatização).

3.1.1. Estudo com o cloreto de dansilo

Com base na bibliografia publicada relativamente à análise de aminas biogénicas em produtos cárneos (ver "Introdução", Tabela 2), optou-se por utilizar o cloreto de dansilo como reagente de derivatização, o mais frequentemente descrito. Para iniciar o processo de optimização das condições analíticas e para se poder comparar os resultados obtidos para os diferentes parâmetros em estudo, foi estabelecido um procedimento experimental base, segundo a bibliografia publicada anteriormente (Malle et al., 1996; Casal et al., 2002), que se descreve a seguir.

Procedimento experimental-base de derivatização com DnCl

Retiraram-se 400µl de solução padrão de trabalho a 100µg/ml (ver "Material e Métodos", ponto 2.3) adicionou-se 1ml de solução saturada de carbonato de sódio. Acertou-se o pH a 11 com 50µl de hidróxido de sódio (1N). Adicionou-se 1ml de cloreto de dansilo com concentração 7,5mg/ml em acetona, e deixou-se em banho de água a 60°C durante 15min ao abrigo da luz. Adicionou-se 100µl de L-prolina com concentração 100mg/ml e protegeu-se da luz durante 15min, de forma a consumir o excesso de derivatizante. Deixou-se arrefecer e adicionou-se 1,5ml de tolueno. De seguida agitou-se no vórtex e refrigerou-se a -20°C durante 15min para facilitar a separação das fases. Retirou-se o sobrenadante e procedeu-se à concentração em corrente de azoto, a 60°C, até à secura total. Retomou-se com 300µl de metanol e centrifugou-se durante 5min a 13000rpm. Transferiu-se o extracto derivatizado para frasco de vidro de 1ml e armazenou-se a -20°C até ao momento da injeção.

Optimização do eluente

Utilizando o procedimento base descrito, obteve-se a mistura de padrões derivatizada, a qual foi seguidamente sujeita a análise por HPLC. Para a realização desta análise, a bibliografia refere frequentemente o uso de acetonitrilo como eluente orgânico e uma solução de ácido fosfórico como eluente aquoso. Pelos motivos referidos anteriormente,

neste trabalho pretendia-se a substituição do acetonitrilo por um outro eluente orgânico. Sendo assim, as soluções derivatizadas com o procedimento base foram analisadas, numa primeira fase, utilizando metanol e ácido fosfórico 0,5mmol/l, como eluente orgânico e aquoso, respectivamente. Com estes eluentes, apesar de se conseguir obter uma boa separação de todos os compostos, à semelhança com o descrito para a utilização de acetonitrilo, o tempo necessário de análise mostrou ser um pouco elevado (cerca de 30 min), semelhante ao apresentado em colunas de maior dimensão. Com o intuito de diminuir o tempo de análise, testou-se um eluente aquoso com maior força iónica e aumentou-se a proporção de solvente orgânico longo do tempo. A escolha recaiu sobre o acetato de amónia 0,1mol/l por ser frequentemente utilizado em trabalhos realizados com o cloreto de dansilo (ver "Introdução", Tabela 2). Devido à propensão para a formação de gás aquando da mistura dos dois eluentes, orgânico e aquoso, optou-se por usar como eluente B uma pré-mistura acetato de amónio/metanol (50:50 v/v). Após diversas optimizações na proporção dos dois eluentes ao longo do tempo conseguiu reduzir-se o tempo de análise para cerca de 10 minutos, com um fluxo de 1ml/min. O gradiente que proporcionou a melhor resolução cromatográfica encontra-se descrito no ponto 2.6.2. da secção "Material e Métodos". A Figura 3 apresenta um cromatograma obtido nestas condições. De salientar a existência de picos adicionais no cromatograma, alguns em co-eluição parcial com as aminas biogénicas. Esta observação permitiu-nos prever que provavelmente as condições de derivatização não estariam perfeitamente optimizadas, agendando essa tarefa para uma fase posterior do trabalho.

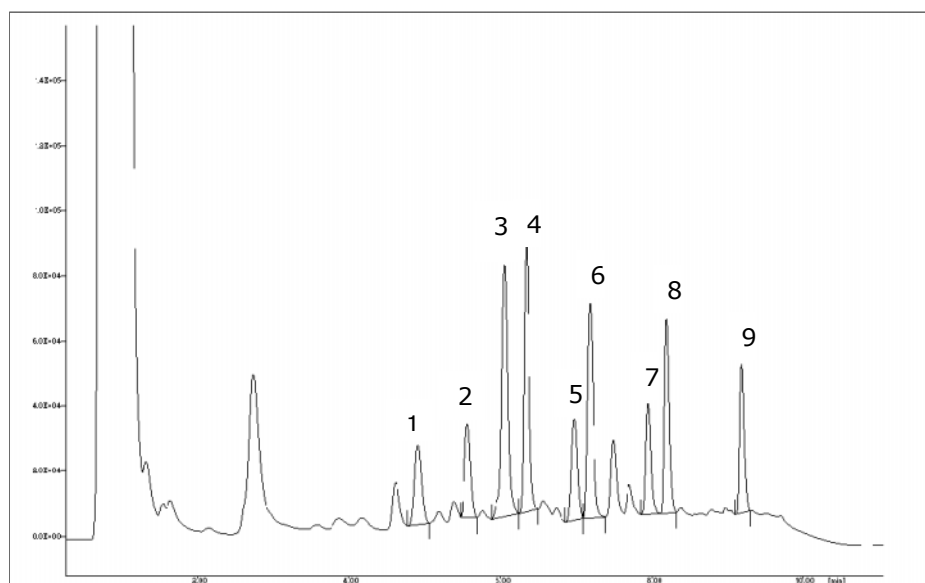


Figura 3 – Cromatograma de uma mistura de padrões com uma concentração de 100µg/ml derivatizada com cloreto de dansilo a 254nm (1- triptamina, 4,9min; 2- β-feniletilamina, 5,6min; 3- putrescina, 6,0min; 4- cadaverina, 6,3min; 5- histamina, 7,0min; 6-PI, 7,2min; 7- tiramina, 7,9min; 8- espermidina, 8,2min; 9- espermina, 9,2min).

Optimização do processo de derivatização

Na literatura encontra-se uma grande diversidade de protocolos, nomeadamente no que respeita a temperaturas e tempos utilizados na reacção de derivatização, utilização de uma solução saturada de carbonato ou bicarbonato de sódio, e utilização de prolina ou amónia para consumir o excesso de cloreto de dansilo utilizado.

Segundo De Antonis e Brown (1997), a reacção de derivatização com *DnCl* é lenta à temperatura ambiente, podendo demorar cerca de 30-35 minutos até estar completa. De acordo com Paulsen et al. (1997), o tempo de reacção pode ser encurtado através do aumento da temperatura de derivatização, sendo usual a utilização de temperaturas entre 40-70°C. Por outro lado, a temperatura utilizada durante a derivatização condiciona simultaneamente a velocidade da reacção entre as amins e o derivatizante, bem como a estabilidade dos derivados formados. Desta forma a relação temperatura/tempo de derivatização é sem dúvida um parâmetro que pode influenciar o rendimento da reacção de derivatização.

O *DnCl* está descrito como um reagente de derivatização que reage com amins 1^{as} e 2^{as} em condições básicas (pH 9-10) para formar derivados que podem ser detectados por UV ($\lambda = \pm 250$ nm) ou fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 360$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 470$ nm) (De Antonis e Brown, 1997). Desta forma, aquando da derivatização de amostras contendo proteínas, como é o caso da matriz em estudo, outros compostos contendo grupos amina primários ou secundários, como aminoácidos, podem igualmente reagir com o cloreto de dansilo. Desta forma, aconselha-se a utilização de um excesso de reagente que garanta a derivatização completa dos compostos em estudo. Por outro lado a presença de excesso de reagente de derivatização no final da reacção não é aconselhável pois pode contribuir para a instabilidade dos derivatizados formados e constituir um interferente cromatográfico na análise. Por conseguinte, este excesso é eliminado pela adição de um reagente (usualmente amónia ou prolina) que reage com este originando compostos que eluem junto da linha do solvente.

Outro parâmetro que varia segundo a bibliografia consultada, é a utilização de uma solução saturada de sal, sendo as mais utilizadas a solução de carbonato de sódio ou de bicarbonato de sódio. Este parâmetro, ao influenciar o pH da mistura reaccional, pode influenciar o rendimento da reacção de derivatização.

Com o objectivo de estabelecer as melhores condições no que respeita aos parâmetros referidos, realizaram-se vários testes os quais incidiram sobretudo na relação temperatura/tempo de derivatização, solução saturada de sal utilizada e substância

adicionada para consumir o excesso de derivatizante utilizado. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 7.

Como se pode observar, com a utilização de carbonato de sódio e com a L-prolina (como neutralizante do excesso de cloreto de dansilo), para a maioria das aminas biogénicas em estudo, obtiveram-se rácios (área da amina em relação à área do padrão interno) aparentemente superiores quando a derivatização foi efectuada a 70°C, durante 15min. Observando os cromatogramas e as áreas correspondentes aos compostos, constata-se que estes resultados não correspondem contudo a uma maior concentração das aminas, mas antes uma degradação do padrão interno. Da mesma forma também a cadaverina e a histamina se degradam nestas condições, originando os menores rácios. Assim, eliminando estas condições, verifica-se que, com ambos os sais, os maiores rácios se verificam com 50 °C/± 60min. Para temperaturas superiores o rendimento é ligeiramente inferior para a generalidade das aminas, apesar de a ordem de grandeza ser bastante semelhante entre elas.

De salientar que para algumas aminas se verificou que uma temperatura de 40 °C seria mais adequada, nomeadamente para a cadaverina, histamina e a espermina, mas as restantes apresentaram rácios muito baixos. Verifica-se claramente que a histamina parece ser fortemente afectada com as condições utilizadas, uma vez que para temperaturas superiores a 40°C ocorre um decréscimo muito significativo dos valores obtidos.

Tabela 7 – Resultados dos rácios obtidos para cada rela o temperatura/ tempo de derivatiza o obtidos com o carbonato e o bicarbonato de sódio.

		A_{amina} / A_{PI}																	
		<i>Carbonato de sódio</i>									<i>Bicarbonato de sódio</i>								
Temperatura (�C):	40	50			60			70			40	50			60				
	tempo (min):	45	30	45	60	5	10	15	5	10	15	45	30	45	60	75	5	10	15
Triptamina	0,435	0,373	0,473	0,559	0,459	0,462	0,467	0,502	0,574	0,810	0,099	0,540	0,500	0,514	0,573	0,489	0,529	0,513	0,518
β -feniletilamina	0,472	0,404	0,483	0,591	0,521	0,470	0,459	0,503	0,558	0,600	0,492	0,521	0,514	0,509	0,565	0,514	0,528	0,590	0,591
Putrescina	1,414	1,261	1,357	1,573	1,398	1,375	1,255	1,468	1,472	1,632	0,486	1,661	1,570	1,794	1,676	1,622	1,692	1,794	1,591
Cadaverina	1,328	1,126	1,202	1,254	1,167	1,373	1,059	1,120	1,095	0,979	1,565	1,251	1,101	1,367	1,264	1,183	1,261	1,296	1,229
Histamina	0,576	0,469	0,554	0,816	0,581	0,475	0,530	0,398	0,355	0,244	1,288	0,090	0,097	0,081	0,103	0,093	0,099	0,098	0,095
Tiramina	0,467	0,506	0,481	0,506	0,490	0,462	0,450	0,463	0,468	0,894	0,910	1,023	0,980	0,989	1,068	0,998	1,084	1,048	1,046
Espermidina	1,181	0,900	1,066	1,366	1,202	0,876	0,711	0,826	0,788	1,346	1,083	1,186	1,108	1,158	1,209	1,127	1,163	1,159	1,146
Espermina	1,192	0,765	1,018	1,333	1,083	0,641	0,519	0,659	0,616	1,002	1,307	1,041	1,007	1,085	1,122	1,043	1,054	1,062	1,038

Desta forma, os resultados sugerem que no caso da reacção de derivatização utilizando bicarbonato de sódio as condições devem ser seleccionadas mediante o objectivo pretendido, isto é, no caso de se pretender avaliar a presença de histamina, que, como referido na secção "Introdução", é de elevada importância dada a sua toxicidade e associação a reacções alérgicas, dever-se-á optar pelas condições de temperatura inferior (40°C/45 min). Se pelo contrário, o objectivo for a avaliação da triptamina e putrescina, esta última associada às condições higieno-sanitárias, recomenda-se a utilização de temperaturas superiores (50°C/60min). Comparando os resultados obtidos para as diversas condições testadas com ambos os sais, o carbonato de sódio parece permitir a obtenção de resultados ligeiramente superiores nos casos da β -feniletilamina e da espermina, assim como resultados claramente superiores nos casos da espermidina e, sobretudo, da triptamina. Já o bicarbonato de sódio, permitiu obter rácios francamente mais elevados para a putrescina, cadaverina, histamina e tiramina.

Uma vez que a utilização destes compostos interfere com o pH da mistura reaccional, procedeu-se ainda à verificação do pH da mistura após a adição da solução saturada de cada um dos sais estudados, bem como a medição do pH após a adição da substância utilizada para eliminar o excesso de reagente derivatizante (prolina ou amónia). Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Registo dos valores de pH ao longo da derivatização.

Após adição da solução saturada		Após a adição do neutralizante			
Carbonato de sódio	Bicarbonato de sódio	Carbonato de sódio com prolina	Carbonato de sódio com amónia	Bicarbonato de sódio com prolina	Bicarbonato de sódio com amónia
12,52	9,65	11,26	11,64	9,62	10,81

Como esperado, os valores de pH foram inferiores com o uso de bicarbonato de sódio comparativamente com o carbonato de sódio. Com o intuito de ver como cada amina se comporta com a alteração do pH durante a derivatização efectuou-se um gráfico com base nos rácios entre as áreas de amina/área de padrão interno obtidos para as diferentes condições de derivatização, o qual se apresenta na Figura 4. Verificou-se que a triptamina e a putrescina tiveram rácios menores a pH 9,62 (com bicarbonato de sódio e prolina), contudo os rácios obtidos foram superiores quando se adicionou amónia, sendo ainda que os rácios foram sempre superiores quando se utilizou amónia. Um comportamento oposto verificou-se no caso da histamina. Esta amina apresentou rácios extremamente diferentes para os vários valores de pH, sendo que o rácio mais elevado foi obtido a pH 9,62 (com bicarbonato de sódio e prolina), o mais baixo foi obtido a pH

mais elevado 11,64 (com carbonato de sódio e amónia) e tendo-se obtido rácios mais elevados quando se usou a prolina. De uma forma geral, os rácios das aminas parecem ser inferiores para os valores de pH superiores: 11,26 (carbonato de sódio/prolina) e 11,64 (carbonato de sódio/amónia). Estes resultados estão de acordo com o descrito por Antonis e Brown (1997) que descrevem o cloreto de dansilo como um derivatizante que reage preferencialmente a pH 9-10. Desta forma, os resultados sugerem que a reacção de derivatização com cloreto de dansilo deverá utilizar preferencialmente uma solução saturada de bicarbonato de sódio, utilizando-se prolina ou amónia segundo o interesse, ou não, em avaliar a presença de histamina.

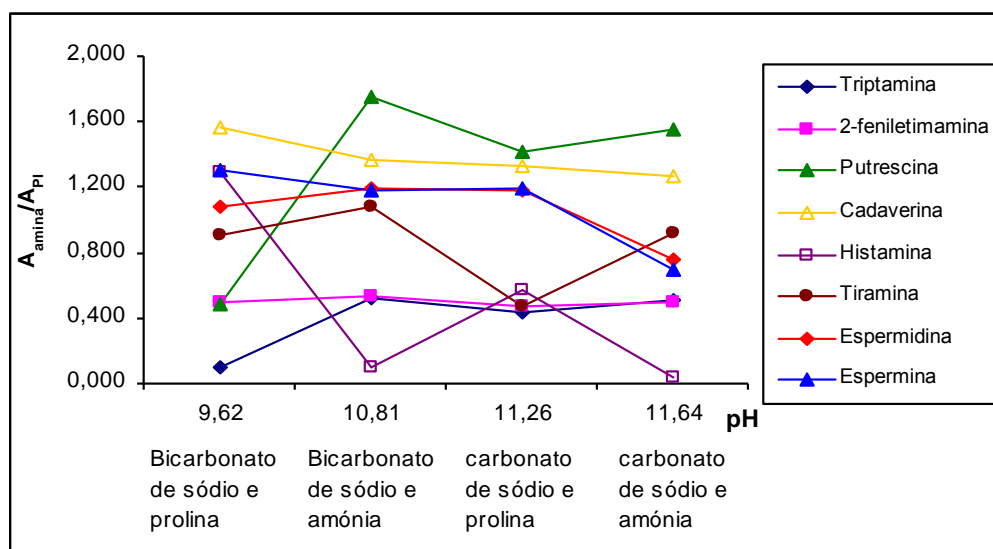


Figura 4 – Resultados obtidos para cada amina a diferentes valores de pH durante a derivatização (os valores de pH referem-se às condições da Tabela 8).

3.1.2. Estudo com o cloreto de dabsilo

Idealmente, o reagente de derivatização, por cada analito, deve produzir um único produto de derivatização estável. A reacção de derivatização deve ser rápida, simples e com elevado rendimento de reacção (De Antonis e Brown, 1997).

No decorrer do estudo realizado com o cloreto de dansilo, apesar deste reagente, com base na bibliografia disponível, ser o mais utilizado para a derivatização de aminas biogénicas, detectaram-se algumas anomalias/dificuldades. Nomeadamente, constatou-se que o mesmo derivatizado injectado em dias diferentes não se mantinha estável, apresentando variações elevadas sobretudo a nível da área do pico correspondente à histamina. Verificou-se igualmente que a histamina originava a formação de diversos derivados, que eram claramente visíveis quando esta era derivatizada sozinha e posteriormente analisada ao longo de diferentes dias. Segundo Brown et al., (2009) o cloreto de dansilo, apesar de ser muito usado neste tipo de estudo, apresenta algumas

desvantagens, tais como o facto de as soluções derivatizadas serem sensíveis à luz, a reacção de derivatização poder ser incompleta e poder ocorrer a formação de múltiplos derivados no caso da histamina. Segundo De Antonis e Brown (1997) podem ainda formar-se produtos secundários da reacção que podem interferir na análise, tais como derivados hidroxilados ou aminados do reagente de derivatização. Por este motivo, optou-se por testar outro derivatizante, o cloreto de dabsilo. Este, apesar de ter algumas características comuns com o cloreto de dansilo, apresenta algumas vantagens, tais como ser estável quando exposto à luz e apresentar uma maior estabilidade dos derivados formados, os quais absorvem na região do visível ($\lambda=436$ nm) com menor probabilidade de existência de interferentes. O maior inconveniente é que a presença de sais, ureia e fosfatos, podem afectar o pH e interferir na reacção de derivatização. Daí que se deva utilizar sais que tenham uma elevada capacidade de tamponar o pH.

Para o estudo com o cloreto de dabsilo, foram preparadas soluções mãe e a solução padrão de trabalho de acordo com Krause et al. (1995), encontrando-se descritas na secção "Material e Métodos" no ponto 2.3. Também neste caso, foi estabelecido um procedimento experimental base para a derivatização (Krause et al., 1995) que se descreve a seguir.

Procedimento experimental- base de derivatização com o DabCl

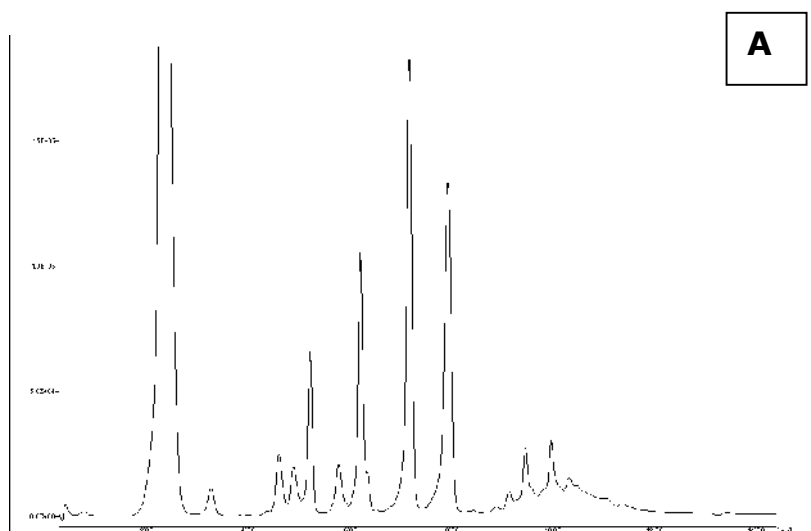
A 20 μ l de solução padrão de trabalho, adicionaram-se 180 μ l de solução tampão de bicarbonato de sódio (descrita no ponto 2.3. da secção "Material e Métodos"). Estas soluções eram agitadas em vórtex. Adicionou-se 200 μ l de cloreto de dabsilo (2 mg/ml em acetona). Os frascos eram agitados e levados à estufa a 70°C durante 15min. Já na estufa, os frascos eram agitados no 1º e no 12º minutos. Passados 15min os frascos eram colocados em gelo durante 5min para terminar a reacção. Centrifugou-se durante 1min a 13000rpm e adicionou-se 400 μ l de uma solução tampão diluída preparada com 50ml de metanol, 25ml etanol e 25ml da solução B que se encontra descrita no ponto 2.6.2 (ver "Material e Métodos"). As soluções eram agitadas após a adição da solução tampão diluída e centrifugadas durante 5min a 13000rpm. O sobrenadante foi colocado em frascos de vidro de 1ml, armazenados a -20°C até ao momento da injeção.

Optimização do eluente

Como referido anteriormente, geralmente as metodologias descritas para análise cromatográfica dos compostos em estudo recorrem ao uso de elevadas quantidades de acetonitrilo. Também com este derivatizante, se pretendeu conseguir a substituição do acetonitrilo por outro solvente orgânico. Com base nos resultados obtidos nos testes

realizados com o cloreto de dansilo, testou-se a utilização de metanol em substituição total do acetonitrilo. Contudo, utilizando 100% metanol, verificou-se que não havia boa resolução cromatográfica visto que a largura (w) da generalidade dos picos aumentava consideravelmente com o uso de metanol puro como eluente orgânico (Figura 5).

Desta forma, testou-se a mistura utilizada por Krause et al. (1995), acetonitrilo/água (80:20,v/v) (Figura 5), para confirmar as resoluções descritas na literatura e ter uma base inicial de comparação, experimentaram-se de seguida diversos eluentes, procurando sempre a substituição do acetonitrilo, na tentativa de obter uma separação cromatográfica semelhante. De uma forma geral, as misturas testadas tiveram por base o critério de substituição de acetonitrilo por metanol (apoiado nos resultados obtidos com o cloreto de dansilo) e a utilização de uma polaridade idêntica à do eluente acetonitrilo/água (80:20, v/v). Testou-se a mistura metanol/água/éter *tert*-metil-butílico (80:10:10, v/v), com base na adaptação do eluente utilizado por Bockhardt et al. (1996) e procedendo à substituição de acetonitrilo por metanol. Com base em cálculos de polaridade, testou-se ainda as misturas metanol/acetona (83:17, v/v) e metanol/éter *terc*-metil-butílico (95:5, v/v), mas também não se obteve uma boa resolução. Por último, testou-se uma mistura de acetonitrilo com metanol (50:50,v/v) tendo-se conseguido obter uma boa resolução cromatográfica. Na impossibilidade de retirar totalmente o acetonitrilo, optou-se então por usar a mistura acetonitrilo com metanol uma vez que este permitia uma considerável poupança de acetonitrilo. Os cromatogramas correspondentes a alguns dos eluentes testados podem ser visualizados na Figura 5. De referir que os cromatogramas foram obtidos sem optimização do gradiente.



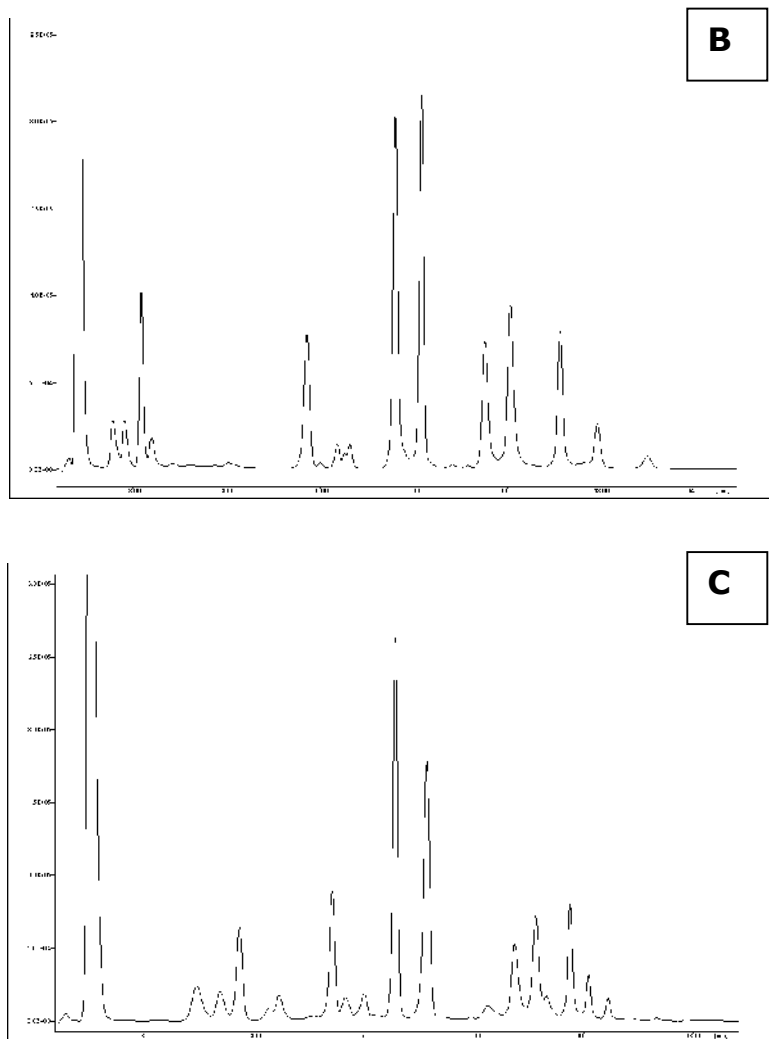


Figura 5 – Cromatogramas de uma mistura de padrões com uma concentração de 2,5 μ mol/ml obtidos com eluentes orgânicos diferentes. (A)- 100% Metanol e eluente aquoso¹; (B)- Acetonitrilo/Água (80:20 v/v) e eluente aquoso²; (C)- Metanol/Acetonitrilo (50:50 v/v) e eluente aquoso¹. (Eluente aquoso¹: como detalhado na secção “Material e Métodos” no ponto 2.6.2; Eluente aquoso²: 100% da solução 9mM de dihidrogenofosfato de sódio, 4% de dimetilformamida e 0,15% de trietilamina, pH=6,55).

Seguidamente, procedeu-se à optimização do gradiente, procurando a melhor resolução cromatográfica dos compostos em análise, tendo-se escolhido o gradiente descrito no ponto 2.6.2. (ver “Material e Métodos”). As condições seleccionadas permitiram obter o cromatograma representado na Figura 6, com uma separação cromatográfica em menos de 7 minutos, com um consumo inferior a 3ml de acetonitrilo por amostra.

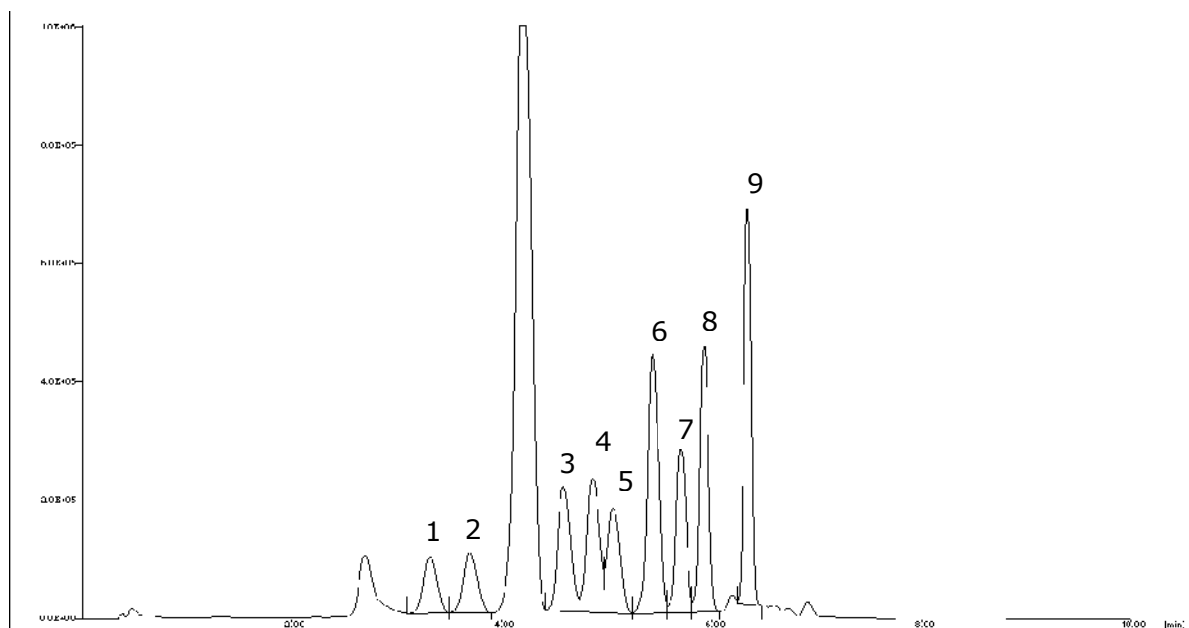


Figura 6 – Cromatograma de uma mistura de padrões com uma concentração de 1,25 $\mu\text{mol/ml}$, derivatizada com cloreto de dabsilo e visualizada a 436nm. (1- triptamina, 3,31min; 2- β -feniletilamina, 3,69min; 3- putrescina, 4,58min; 4- cadaverina, 4,86min; 5- histamina, 5,06min; 6-PI, 5,43min; 7- tiramina, 5,70min; 8- espermidina, 5,92min; 9- espermina, 6,33min).

Optimização das condições de derivatização:

À semelhança do que acontece com o cloreto de dansilo, as derivatizações feitas com o cloreto de dabsilo necessitam de uma solução tamponada em que se usa o bicarbonato de sódio.

Castillo e Castells (2001), após efectuarem derivatizações com carbonato de sódio e com bicarbonato de sódio, concluíram que o rendimento da reacção aumentava quando se usavam soluções tampão de bicarbonato de sódio. Os autores referem que a força iónica das soluções de carbonato de sódio é superior à de soluções de bicarbonato de sódio de igual concentração, o que poderá provocar uma menor solubilidade do reagente de derivatização, obtendo-se rendimentos superiores para as reacções de derivatização efectuadas com bicarbonato de sódio. Por este motivo não se efectuou o estudo com as duas soluções, como no caso do cloreto de dansilo, e todas as derivatizações foram realizadas com uma solução tamponada de bicarbonato de sódio.

Castillo e Castells (2001) realizaram igualmente testes temperatura/tempo de derivatização tendo obtido rendimentos semelhantes para qualquer uma das temperaturas de derivatização estudadas (30, 50 e 70°C) caso os tempos de derivatização fossem suficientemente longos para as temperaturas inferiores. Verificaram

também que a decomposição do reagente durante a derivatização aumenta com a temperatura, a 70°C obtiveram-se picos referentes ao excesso de derivatizante menores e verificaram também que as áreas obtidas para cada amina não diminuíam. Sendo assim optou-se por efectuar a derivatização a 70°C. A esta temperatura foram testados diferentes tempos de reacção (Tabela 9).

No mesmo estudo (Castillo e Castells, 2001) realizaram a extracção da mistura de reacção com um solvente orgânico, tal como descrito em alguns trabalhos com cloreto de dabsilo, como alternativa ao simples uso de uma solução tampão para diluição. Esta abordagem, apresenta a vantagem de evitar a extracção de compostos altamente polares ou iónicos, que permanecem na fase aquosa. Segundo os autores, solventes orgânicos com baixa densidade, como é o caso dos hidrocarbonetos aromáticos (tolueno e benzeno), facilitam a etapa da limpeza e dão origem a resultados mais reprodutíveis. Desta forma, optou-se por introduzir um passo de limpeza com tolueno, sendo depois os extractos orgânicos levados à evaporação do solvente em corrente de azoto. Apesar de esta etapa constituir um acréscimo no tempo de análise, verificou-se neste estudo que a limpeza com o tolueno é extremamente importante visto que diminuiu a quantidade de interferentes na linha de base, consequentemente aumentou a resolução cromatográfica.

A concentração de dabsilo é também um parâmetro importante, uma vez que concentrações excessivas são responsáveis pelo aparecimento de picos interferentes nos cromatogramas o que piora a resolução cromatográfica.

Realizaram-se testes com diferentes concentrações de cloreto de dabsilo/tempo de derivatização com o objectivo de estabelecer as melhores condições de derivatização. As concentrações escolhidas para os testes foram escolhidas com base na bibliografia (Krause et al., 1995 e Castillo e Castells, 2001). Os resultados obtidos encontram-se registados na Tabela 9.

Como se pode observar, com uma concentração 2mg/ml de cloreto de dabsilo obtiveram-se rácios superiores quando a derivatização foi efectuada entre 20 e 25min à excepção da triptamina que obteve o rácio mais elevado com 30min de derivatização. A 25min o rácio obtido para a espermina foi claramente superior. O tempo óptimo para efectuar a derivatização situa-se entre 20 a 25min quando usado 2mg/ml.

Com a concentração 4mg/ml de cloreto de dabsilo obtiveram-se rácios superiores a 10, 15 e 20min, sendo que com 15 e 20min de derivatização os rácios obtidos para a histamina, tiramina, espermidina e a espermina foram superiores aos obtidos com 10min de derivatização. Como os rácios com 15 e 20min de derivatização são semelhantes e visto que o rácio obtido para a putrescina diminuiu com o aumento da temperatura para 20min, deve-se optar por fazer a derivatização entre 15 a 20min com 4mg/ml.

Tabela 9 – Resultados dos rácios obtidos para cada relação concentração de cloreto de dabsilo/ tempo de derivatização.

Amina	2mg/ml					4mg/ml				
	A_{Amina}/A_{PI}					A_{Amina}/A_{PI}				
	10min	15min	20min	25min	30min	10min	15min	20min	25min	30min
Triptamina	0,47	0,48	0,45	0,44	0,49	0,46	0,43	0,44	0,39	0,45
β -feniletilamina	0,49	0,48	0,50	0,48	0,46	0,44	0,47	0,46	0,41	0,47
Putrescina	0,74	0,74	0,78	0,81	0,59	0,78	0,90	0,86	0,85	0,85
Cadaverina	0,81	0,82	0,83	0,82	0,69	0,88	0,91	0,88	0,82	0,86
Histamina	0,57	0,57	0,59	0,55	0,51	0,64	0,70	0,71	0,72	0,69
Tiramina	0,68	0,67	0,72	0,74	0,58	0,74	0,77	0,79	0,81	0,79
Espermidina	0,73	0,75	0,79	0,78	0,57	0,89	1,08	1,07	1,18	1,12
Espermina	0,79	0,82	0,89	0,94	0,55	1,03	1,41	1,29	1,41	1,39

Se a matriz analisada tiver um teor elevado de aminas biogénicas ou se se pretender analisar aminoácidos e aminas biogénicas em simultâneo teria que se derivatizar com uma concentração 4mg/ml de cloreto de dabsilo para haver a garantia que no final da reacção ainda existe um excesso de cloreto de dabsilo. Esse excesso é necessário visto que na amostra existem aminoácidos e outros interferentes que podem consumir o derivatizante antes das aminas biogénicas.

Observando os cromatogramas obtidos das amostras derivatizadas com 2mg/ml e 4mg/ml de cloreto de dabsilo verificou-se que como as amostras apresentavam um baixo teor de aminas biogénicas eram necessárias apenas 2mg/ml para garantir o excesso de cloreto de dabsilo no final da reacção.

Por último, refira-se que com a utilização de cloreto de dabsilo como derivatizante se verificou que os derivados eram estáveis ao longo do tempo, nomeadamente a histamina, permitindo que as injeções possam ser feitas passadas 24h, mesmo sem necessidade de refrigeração. Tal constitui uma vantagem, uma vez que poderia ser instalado um sistema automático de injeção.

Fase estacionária

Como referido inicialmente, este trabalho visou o desenvolvimento de uma metodologia analítica mais rápida, económica e menos poluente do que as disponíveis na literatura. Para tal, tentou-se a utilização de colunas cromatográficas de reduzidas dimensões, na tentativa de obter resoluções cromatográficas satisfatórias num menor espaço de tempo. A utilização de uma coluna monolítica constituiu uma primeira abordagem, pelas vantagens divulgadas pelo fabricante e descritas anteriormente. Assim, começou-se a

fazer o estudo com o cloreto de dabsilo com a coluna monolítica Chromolith® Performance RP-18 endcapped, tendo-se testado posteriormente a performance de uma coluna C18 de enchimento comum (Discovery® C18, 5cmx3mm i.d., 5µm tamanho de partícula). Verificou-se que os resultados obtidos foram idênticos, conseguindo uma resolução idêntica no mesmo espaço de tempo, não constituindo por isso uma mais valia a aplicação da coluna monolítica para esta análise em concreto.

Para além do menor tempo cromatográfico e melhor estabilidade dos derivados, a derivatização com cloreto de dabsilo consome menor volume de reagentes, quer orgânicos quer do próprio derivatizante, quando comparada com o cloreto de dansilo. Apesar de não ter sido conseguida a eliminação total do acetonitrilo, o consumo deste por injeção é de apenas aproximadamente 3 ml, o que, em contraponto com as vantagens referidas, constitui, no seu conjunto, o melhor método de análise para as aminas biogénicas. Desta forma foi este o método escolhido para as análises subsequentes, tendo sido efectuada a sua validação.

3.2. Validação do método

A validação de um método analítico tem como finalidade a avaliação das características do método, o controlo das variáveis que afectam o resultado e a avaliação da incerteza global associada ao método.

Após optimização do método, efectuou-se o estudo dos parâmetros analíticos: linearidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação e a recuperação.

A validação do método foi realizada apenas com o derivatizante cloreto de dabsilo, que se mostrou como melhor opção nos testes efectuados previamente. Para o estudo de validação do método, utilizou-se sempre a mesma amostra de chouriço comercial.

3.2.1. Linearidade

Representa a capacidade que o método tem em fornecer resultados directamente proporcionais à concentração da substância em estudo (Ribani et al., 2004).

Para a quantificação dos compostos em estudo usou-se o método do padrão interno, com o 1,7-diaminoheptano.

Inicialmente foi feita uma solução padrão mãe, sem PI, conforme descrita na secção "Material e Métodos" no ponto 2.3. Foram feitas várias diluições à solução anterior, de forma a obter curvas de calibração com concentrações entre cerca de 1 e 100 µg/ml

(0,01-1,25 $\mu\text{mol/ml}$), dependendo da massa molecular de cada amina, sempre com 0,33 mg de PI e TDPA (0,02g). Todas as soluções foram preparadas em HCl 0,1M e mantidas a 4°C. As diferentes soluções foram submetidas ao protocolo descrito na secção "Material e Métodos" no ponto 2.5.2). De cada mistura de padrões foram efectuadas 2 injeções. O coeficiente de variação da injeção foi sempre inferior a 1% com soluções padrão, e sempre inferior a 5% com amostras.

Na Figura 7 apresentam-se exemplos de curvas de calibração e as respectivas equações da recta para cada composto em estudo.

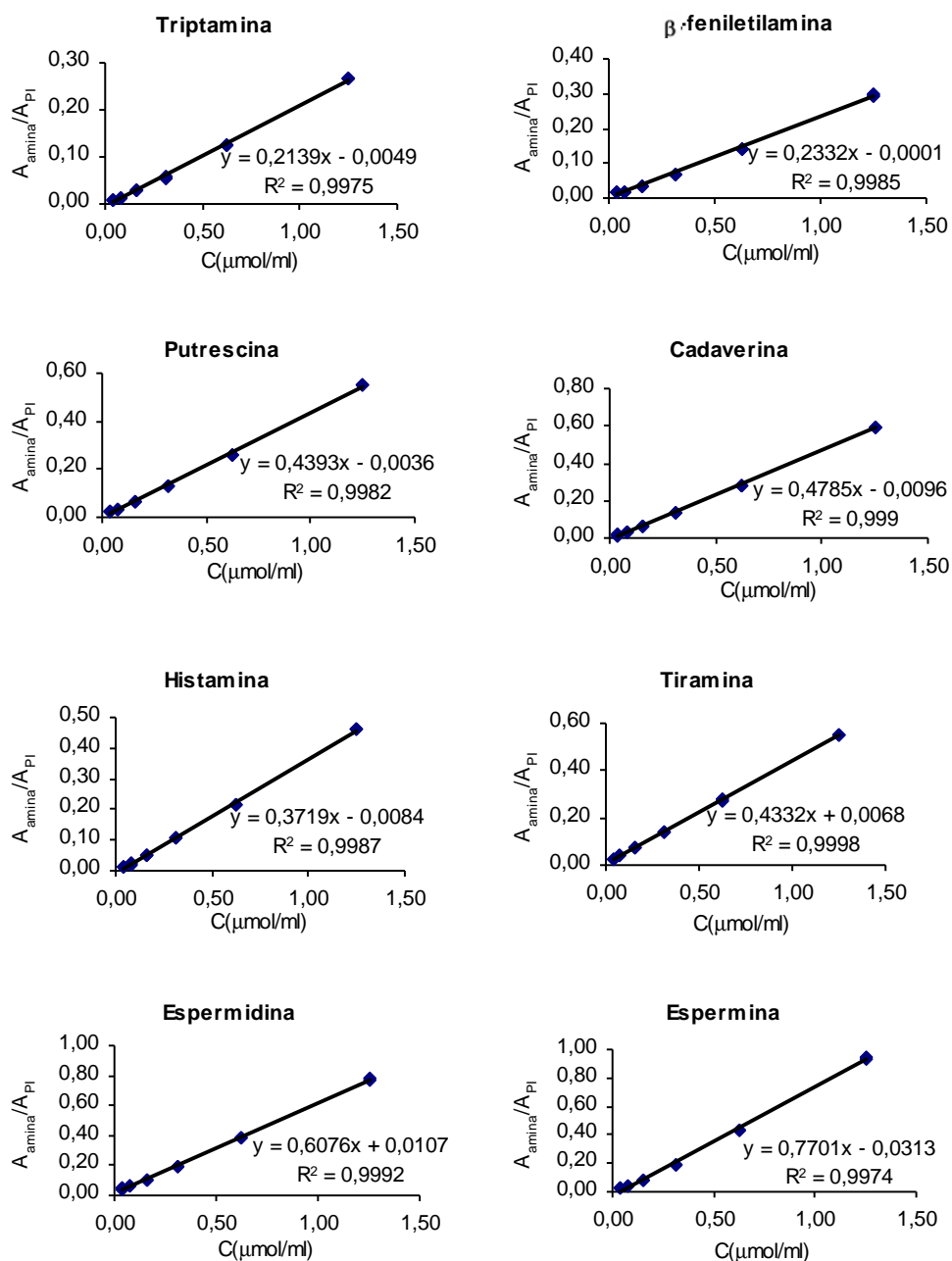


Figura 7 – Curvas de calibração para os compostos em estudo, derivatizados com cloreto de dabsilo e visualizados cromatograficamente a 436nm.

O coeficiente de correlação quadrático (R^2), para todas as aminas foi superior a 0,99 o que comprova a linearidade do método, ou seja, existe uma relação entre a resposta instrumental e a concentração da amina, mostrando-se o padrão adequado e as condições de derivatização estáveis.

3.2.2. Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em estudo que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em estudo que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (Ribani et al., 2004).

O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados como sendo a concentração correspondente a três vezes o desvio-padrão do ruído de fundo e dez vezes o desvio-padrão do ruído de fundo, respectivamente. O limite de detecção variou de 2 a 11mg/kg, e o limite de quantificação entre 6 a 35mg/kg, segundo a amina em causa. Os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação em cada uma das aminas encontram-se registados na Tabela 10.

3.2.3. Precisão da extracção

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra (Ribani et al., 2004). Esta pode ser avaliada através da repetibilidade e da precisão intermédia.

Repetibilidade ou precisão intra-dia

Esta define a precisão do método em repetir num espaço curto de tempo, os resultados obtidos. Na Tabela 10 encontram-se registados os valores da precisão intra-dia, variando de 2,3 a 15,2%.

Precisão intermédia ou precisão inter-dia

Define a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são feitas em dias diferentes.

Na Tabela 10 encontram-se registados os valores obtidos para a precisão inter-dia, cujos valores variam de 8,8 a 15,3%.

3.2.4. Recuperação

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (Ribani et al., 2004).

Usou-se o método da adição de padrão para calcular a recuperação de cada composto em estudo. Como a metodologia se destinava a ser aplicada em amostras de enchidos, a mesma amostra de um chouriço comercial foi utilizada ao longo do estudo de validação. A esta amostra, adicionaram-se quantidades conhecidas de soluções padrão de trabalho, contendo cada uma das aminas, com 3 níveis de concentração, em duplicado para cada nível.

As recuperações médias obtidas para cada composto em estudo encontram-se registadas na Tabela 10. Verifica-se que os níveis de recuperação são bastante satisfatórios para a generalidade das aminas. Apenas na triptamina o resultado foi inferior, mas tal relaciona-se possivelmente com o elevado coeficiente de variação obtido para esta amina.

Tabela 10 – Parâmetros relativos à validação do método.

	<i>Tempo de retenção</i>		<i>Linearidade</i>	<i>Limites</i>		<i>Precisão de extracção</i>		<i>Recuperação</i>	
	min	CV % (n=10)	Gama de concentração (mg/ml)	Detecção (mg/kg)	Quantificação (mg/kg)	intra-dia CV% (n=3)	inter-dia CV% (n=3)	média % (n=6)	CV%
Triptamina	3,29	1,68	0,0063-0,2003	11	35	15,2	13,6	81,6	19,11
β -feniletilamina	3,68	1,24	0,0047-0,1515	8	27	5,5	8,8	96,3	1,18
Putrescina	4,58	1,29	0,0034-0,1102	2	8	13,0	12,5	104,4	4,81
Cadaverina	4,84	0,90	0,0040- 0,1278	2	6	8,8	8,7	96,6	6,56
Histamina	5,04	0,85	0,0043- 0,1390	3	11	13,4	9,9	100,7	2,45
Tiramina	5,68	0,58	0,0054- 0,1715	2	7	4,0	15,3	95,1	12,61
Espermidina	5,89	0,48	0,0057- 0,1816	2	6	7,3	14,9	91,6	6,45
Espermina	6,33	0,42	0,0079- 0,2530	3	9	2,3	9,7	97,7	0,08

3.3. Análise de aminas biogénicas em enchidos por HPLC

Depois de desenvolvida a metodologia de análise, procedeu-se à sua aplicação nas amostras de enchidos adquiridas em superfícies comerciais (ver "Material e Métodos; Tabela 3).

As amostras foram analisadas pelo método do padrão interno para tal efectuaram-se curvas de calibração com concentrações (0,00978; 0,0195; 0,0391; 0,0781; 0,1563; 0,3125 e 0,625 $\mu\text{mol/ml}$) como descrito na secção da "Validação do método" (ponto 3.2.1). Adicionou-se a mesma quantidade (797 μl) da solução mãe de PI com concentração de 4,085mg/ml e TDPA (0,02g) a cada solução.

As diferentes soluções padrão e os extractos resultantes de cada amostra foram submetidos ao protocolo descrito na secção de Material e Métodos (ponto 2.5.2). Para cada amostra, foram feitas duas extracções, sendo que cada extracto foi analisado em duplicado. Na Figura 8 encontra-se um cromatograma representativo de uma amostra estudada.

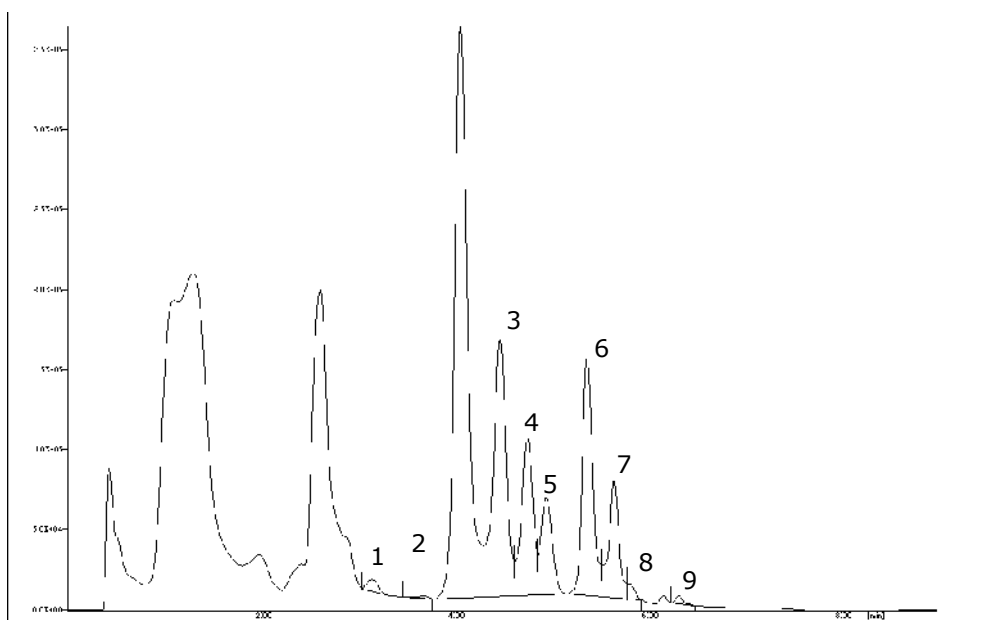


Figura 8 – Cromatograma obtido para o enchido C6 derivatizado com cloreto de dabsilo a 436nm. (1- triptamina; 2- β -feniletilamina; 3- putrescina; 4- cadaverina; 5- histamina; 6-PI; 7- tiramina; 8- espermidina; 9- espermina).

O teor de aminas biogénicas obtido em cada amostra foi calculado com recurso às equações da recta obtidas para cada amina. Na Tabela 11 encontram-se registados os teores obtidos para cada amina nas diferentes amostras.

Tabela 11 – Registo do teor de aminas biogénicas obtido para cada amostra

	teor de AB expresso em (mg/kg)							
	C1 ^a	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Triptamina	n.q ^b	n.q	n.q	n.q	378,99	157,57	152,24	53,68
β-feniletilamina	196,65	240,19	86,12	65,25	n.d	50,40	n.d	n.d
Putrescina	26,70	228,97	141,71	76,57	265,64	527,38	n.d	514,17
Cadaverina	87,00	100,05	25,40	97,68	228,78	572,03	25,96	69,55
Histamina	195,33	n.d ^c	33,66	n.d	n.d	591,70	n.d	n.d
Tiramina	93,84	94,72	68,18	102,09	275,60	360,27	97,34	208,07
Espermidina	76,05	87,25	n.d	n.d	71,41	51,95	59,23	38,21
Espermina	21,42	18,45	18,37	9,56	22,86	27,08	31,44	23,62

^a C1-C8: amostras de chouriços estudadas; ^b n.q: não quantificada; ^c n.d: não detectada

Observando a Tabela 11 verifica-se que as aminas detectadas em maior concentração neste trabalho foram a putrescina, a cadaverina e a tiramina.

Segundo a bibliografia consultada, a tiramina é a amina biogénica mais abundante na generalidade dos enchidos fermentados. Estes produtos, tendencialmente apresentam quantidades relativamente reduzidas de diaminas, putrescina e cadaverina, porém, alguns podem acumular grandes montantes, que podem mesmo exceder o conteúdo de tiramina. Neste estudo, verificou-se que em algumas amostras (C2 e C6), ambas as diaminas, putrescina e cadaverina, apresentaram teores superiores aos obtidos para a tiramina. De acordo com (Vidal-Carou et al., 2009) os valores médios descritos na literatura para a putrescina e a cadaverina são 89mg/kg e 44mg/kg, respectivamente sendo que estas aminas, juntamente com a tiramina, poderão indicar a existência de más práticas de higiene. Cinco das amostras estudadas apresentaram valores superiores ao valor médio referido para a putrescina e apenas duas amostras apresentaram valores inferiores aos referidos para a cadaverina. De realçar que as amostras C6 e C8 apresentaram teores anormalmente elevados de putrescina (cerca de 500mg/kg), sendo que a primeira apresentou igualmente teores superiores a 500 mg/kg de cadaverina. Apesar destas aminas não serem consideradas tóxicas, são precursoras, por reacção com o nitrito, de nitrosaminas carcinogénicas, pelo que o seu estudo se revela de extrema importância. No que respeita a presença de tiramina, a qual está associada a reacções vasoactivas sobretudo no caso de pacientes medicados com fármacos IMAO, o teor médio referidos na bibliografia é de 140 mg/kg (Vidal-Carou et al., 2009), sendo aconselhado que os teores não ultrapassem os 100-200 mg/kg. Nas amostras estudadas, verifica-se que 3 amostras apresentam teores superiores aos referidos (C5, C6 e C8).

Como referido, a acumulação das aminas biogénicas referidas anteriormente, nomeadamente a putrescina, cadaverina e a tiramina nos produtos cárneos em concentrações acima dos níveis aceitáveis (100 a 200mg/kg para a tiramina, 50mg/kg para a putrescina e para a cadaverina) e até o aparecimento da histamina, pode ser considerado como resultado de más práticas de higiene. Interessantemente, para a amostra C5, que apresenta os teores mais elevados de putrescina, cadaverina e tiramina, todos eles, muito superiores aos valores referidos na literatura. A histamina e a β -feniletilamina não foram detectadas nas amostras C5, C7 e C8. Como referido na secção “Introdução”, a histamina e em menor grau a β -feniletilamina podem desencadear reacções adversas nos consumidores, daí que seja desejável a ausência destes compostos nos alimentos. Contudo, apenas se encontra legislado o teor máximo de histamina em peixe (100 mg/kg), não existindo legislação no caso dos produtos cárneos. As poliaminas naturais, espermina e espermidina, apresentaram os menores teores de todas as aminas em estudo, não se tendo detectado espermidina nas amostras C3 e C4. Apesar de algumas amostras apresentarem teores ligeiramente superiores no caso da espermina, a generalidade dos valores obtidos encontram-se de acordo com os referidos na literatura (valores médios de 23mg/kg para a espermina e 7mg/kg para a espermidina).

As amostras seleccionadas para aplicação da metodologia optimizada, apresentaram teores variáveis dos compostos em estudo. De entre as amostras analisadas, a amostra C7 foi a que apresentou os valores mais reduzidos da maioria das aminas, não tendo sido detectada a presença de três das oito aminas estudadas, nomeadamente β -feniletilamina, putrescina e histamina. Esta amostra trata-se de um chouriço tradicional de marca, proveniente do Alentejo. Os teores baixos de aminas, poderão estar relacionados com a qualidade das matérias-primas utilizadas e cumprimento escrupuloso de condições higieno-sanitárias ao longo do processamento. Das amostras analisadas, também C4 e C8 eram chouriços tradicionais de marca, sendo contudo de origens diferentes. C4 apresentou teores razoáveis da maioria das aminas, à excepção do teor algo elevado de β -feniletilamina; já em C8, apesar de não se detectar a presença de β -feniletilamina e de histamina, verificaram-se teores anormalmente elevados de putrescina. Pelo facto das amostras de chouriço C4, C7 e C8 não se apresentarem embaladas em atmosfera protectora, poderia ser de esperar que apresentassem teores de aminas biogénicas superiores, dado que a embalagem em atmosfera modificada diminui o crescimento microbiano. Tal parece não se verificar, o que poderá estar relacionado com a qualidade das matérias-primas utilizadas, condições de processamento.

Relativamente às restantes amostras, verificou-se que uma das amostras de marca branca apresentou teores muito elevados de histamina e β -feniletilamina, sendo a amostra com o teor mais baixo de putrescina, a outra não apresentou histamina, mas obteve valores muito elevados de β -feniletilamina, e a terceira, apesar de não ter sido detectada a presença de histamina e β -feniletilamina, apresentou teores muito elevados de tiramina, putrescina e cadaverina. Relativamente aos “produtos de selecção” de marca branca, ambos com a particularidade de serem as únicas amostras que não referiam no rótulo a adição de conservantes, uma delas apresentou teores razoáveis para a maioria das aminas (à excepção de teores algo elevados de β -feniletilamina e putrescina, comparativamente ao descrito na literatura); já a outra, apresentou teores muito elevados de tiramina, putrescina, cadaverina e triptamina, mas ausência de histamina e β -feniletilamina.

Dado o número muito restrito de amostras analisadas, não se consegue relacionar teores de aminas com o facto de o chouriço ser de marca branca ou chouriço tradicional de marca, nem com o tipo de embalagem utilizada. Contudo, verifica-se a presença destes compostos, por vezes com teores superiores aos referidos na bibliografia, daí que pareça ser de interesse a realização de um estudo pormenorizado, abrangendo um número representativo de amostras.

4. CONCLUSÃO

Com esta dissertação, pretendia-se o desenvolvimento de um método cromatográfico dirigido à análise do teor de aminas biogénicas em enchidos, que não utilizasse acetonitrilo, dado a escalada de preço deste solvente derivado à crise internacional, e simultaneamente permitisse uma redução do consumo total de solventes orgânicos por amostra, tornando a análise económica e ambientalmente mais amigável. Dado a existência de uma vasta gama de metodologias utilizadas na derivatização destes compostos, a comparação de resultados obtidos com diferentes derivatizantes e selecção da melhor metodologia, constituiu um segundo objectivo do trabalho. Desta forma, iniciou-se o estudo com a optimização do eluente orgânico, o que foi conseguido na perfeição para o cloreto de dansilo, uma vez que se verificou uma boa resolução cromatográfica, num curto espaço de tempo, substituindo totalmente o acetonitrilo por metanol. No caso da derivatização com o cloreto de dabsilo, tal não foi possível uma vez que a resolução cromatográfica obtida com 100% de metanol não era boa, mas, de certo modo, conseguiu-se alcançar o objectivo proposto uma vez que apesar de usar acetonitrilo:metanol (50:50, v/v) a quantidade gasta de acetonitrilo por amostra era mínima (~ 3ml). Tal foi possível, atendendo à escolha da fase estacionária que permitiu encurtar o tempo de análise comparativamente com o descrito na bibliografia. Testaram-se duas colunas diferentes, uma coluna cromatográfica monolítica de fase reversa Chromolith® Performance RP-18 endcapped (tempo de análise ~11min) e uma coluna tradicional de sílica Discovery® C18 (tempo de análise ~9min), conseguindo-se com ambas resultados similares, conseguindo encurtar o tempo de análise o que permitiu um menor gasto de eluentes sem comprometer a análise cromatográfica das oito aminas em estudo.

A optimização da metodologia analítica para a determinação de aminas biogénicas foi iniciada com o cloreto de dansilo, tendo-se testado vários parâmetros de derivatização diferentes (tempo, temperatura, solução saturada e neutralizador do excesso de derivatizante). Assim, e usando duas soluções saturadas, o carbonato de sódio e o bicarbonato de sódio, tendo como finalidade a sua comparação, realizaram-se testes temperatura/tempo de derivatização para cada solução saturada. Concluiu-se que quando se usava o carbonato de sódio e a prolina como neutralizador do excesso de DnCl, obtinham-se resultados melhores a 50 °C/± 60min de derivatização. Verificou-se também que para temperaturas superiores (60 e 70°C) o rendimento é ligeiramente inferior. A temperatura óptima de derivatização com carbonato de sódio e prolina para a cadaverina, histamina e para a espermina foi de 40°C, mas não se verificou o mesmo

para as restantes aminas. Concluiu-se que com o carbonato de sódio não havia uma conformidade no que diz respeito à temperatura de derivatização ideal uma vez que para a histamina as condições ideais são 40°C/45 min, esta é fortemente afectada quando (> a 40°C), já para a triptamina e a putrescina o ideal seria 50°C/60min. Estudou-se também o efeito do pH na derivatização, concluiu-se que de uma maneira geral que os rácios obtidos para cada amina são inferiores com pH superior 11,26 com carbonato de sódio e prolina e para pH de 11,64 com carbonato de sódio e amónia. Com base nos resultados obtidos, quando se realiza a derivatização com este derivatizante, os melhores resultados parecem ser conseguidos quando se utiliza uma solução saturada de bicarbonato de sódio e amónia como neutralizante do excesso de DnCl, aconselhando-se a substituição desta última por ou prolina quando se pretende obter melhores resultados para a histamina, a qual apresenta uma toxicidade elevada quando se encontra na presença de outras aminas, sendo por isso necessária a sua quantificação.

Contudo, ao longo do estudo utilizando o cloreto de dansilo como derivatizante, constatou-se que o mesmo derivatizado injectado em dias diferentes não se mantinha estável, apresentando variações elevadas sobretudo a nível da área do pico correspondente à histamina, verificando-se ainda que a histamina frequentemente originava a formação de diversos derivados. Assim, optou-se por testar outro derivatizante, o cloreto de dabsilo. Optimizou-se uma metodologia para a derivatização com o cloreto de dabsilo em que se optimizaram os parâmetros: utilização de um solvente orgânico e concentração de cloreto de dabsilo /tempo de derivatização. Verificou-se que ao introduzir uma etapa de limpeza usando como solvente orgânico o tolueno, a quantidade de interferentes na linha de base diminuiu consideravelmente, aumentando a resolução cromatográfica. Como outro parâmetro que influencia a quantidade de interferentes na linha de base é a concentração de cloreto de dabsilo realizaram-se testes a diferentes tempos de derivatização. Concluiu-se que quando se efectua a derivatização com 2mg/ml o tempo óptimo de derivatização situa-se entre 20 a 25min, quando se usa 4mg/ml de cloreto de dabsilo deve optar-se por fazer a derivatização entre 15 a 20min. Observou-se neste estudo que o uso de 2mg/ml de cloreto de dabsilo era suficiente no caso concreto em estudo, uma vez que as amostras apresentavam um baixo teor de aminas biogénicas. Só seria necessário usar concentrações mais elevadas de cloreto de dabsilo se a amostra tivesse elevadas quantidades de aminas ou caso se pretendesse analisar em simultâneo aminas biogénicas e aminoácidos. Verificou-se que o uso do cloreto de dabsilo apresenta vantagens em relação ao cloreto de dansilo, uma vez que a estabilidade dos derivados é maior, resulta num menor tempo de análise e o consumo de reagentes é menor, tanto de cloreto de dabsilo como de eluentes.

De forma a validar a metodologia seleccionada, foi realizado um estudo da gama de linearidade, dos limites de detecção e quantificação, da precisão e da recuperação do método. A gama linear de concentrações obtida situa-se entre 0,0063 e 0,2530 mg/ml, os limites de detecção e de quantificação variam de 2 a 11mg/kg e entre 6 e 35mg/kg, respectivamente, dependendo da amina em análise. As recuperações médias obtidas encontram-se entre 81,6 e 100,7% para a triptamina e a histamina, respectivamente. A metodologia foi aplicada à análise de amostras comerciais, verificando-se em algumas amostras, teores superiores de algumas aminas biogénicas comparativamente aos valores referidos na bibliografia, daí que pareça ser de interesse a realização de um estudo pormenorizado, abrangendo um número representativo de amostras.

Com esta dissertação pretendeu-se contribuir para um melhor conhecimento sobre o teor de aminas biogénicas em enchidos portugueses, através do desenvolvimento de uma metodologia cromatográfica que possa ser utilizada em trabalhos futuros visando a análise destes compostos num produto tradicionalmente consumido pela população Portuguesa.

BIBLIOGRAFIA

- Ansorena D., Montel M.C., Rokka M., Talon R., Eerola S., Rizzo A., Raemaekers M., Demeyer D., Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production, *Meat Sci.* 61 (2002) 141–147.
- Balamatsia C.C., Paleologos E.K., Kontominas M.G. and Savvaidis I.N., Correlation between microbial flora, sensory changes and biogenic amines formation in fresh chicken meat stored aerobically or under modified atmosphere packaging at 4°C: possible role of biogenic amines as spoilage indicators, *Antonie Van Leeuwenhoek* (2006).
- Barreiro F., Métodos Instrumentais de Análise II – Manual de Apoio. (2003) Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior de Tecnologia e de Gestão, Bragança.
- Bockhardt A., Krause I., Klostermeyer H., Determination of biogenic amines by RP-HPLC of the dabsyl derivatives, *Z. Lebensm. Unters Forsch* (1996) 203, 65.
- Bover-Cid S., Schoppen S., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou M.C., Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages, *Meat Science* 51 (1999) 305-311.
- Bover-Cid S., Hernández-Jover T., Miguélez-Arrizado M.J., Vidal-Carou M.C., Contribution of contaminant enterobacteria and lactic acid bacteria to biogenic amine accumulation in spontaneous fermentation of pork sausages, *Eur. Food Res. Technol.* 216 (2003) 477–482.
- Brow P. R., Grushka E., *Advances in Chromatography* (2009), vol 37, Taylor & Francis.
- Casal S., Oliveira M. B. P. P., Ferreira M. A., Determination of Biogenic Amines Coffee by an Optimized Liquid Chromatographic Method. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* (2002), 25 (16), 2535 – 2549.
- Castillo M. A., Castells R. C., Procedure for the determination of biogenic amines by derivatization with dabsyl chloride and reverse phase liquid chromatography, *Chromatographia* (2001), 54, 711-716.
- De Antonis, Brow P. R., *Analysis of Derivatized Peptides using High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis* (1997), Taylor & Francis.
- Eerola S., Hinkkanen R., Lindfors E., Hirvi T., Liquid Chromatographic Determination of biogenic amines in dry sausages , *Journal of AOAC international* vol. 76 (1993) No. 3.
- Fadda S., Vignolo G., Oliver G., Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains, *Biotechnol. Lett.* 23 (2001) 2015–2019.
- Ferreira V., Barbosa J., Silva J., Vendeiro S., Mota A., Silva F., Monteiro M. J., Hogg T., Gibbs P., Teixeira P., Chemical and microbiological characterisation of “Salpicão de

- Vinhais" and "Chouriça de Vinhais": Traditional dry sausages produced in the North of Portugal, *Food Microbiol.* 24 (2007) 618 – 623.
- Gençcelep H., Kaban G., Kaya M., Effects of starter cultures and nitrite levels on formation of biogenic amines in sucuk, *Meat Sci.* 77 (2007) 424–430.
- Gençcelep H., Kaban G., Aksu M. İ., öz F., Kaya M., Determination of biogenic amines in sucuk, *Food Control* 19 (2008) 868–872.
- Gosetti F., Mazzucco E., Gianotti V., Polati S., Gennaro M.C., High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of biogenic amines in typical piedmont cheeses. *J. Chromatogr. A* 1149 (2007) 151-157.
- Hernández-Jover T., Izquierdo-Pulido M., Veciana-Nogués M. T., Vidal-Carou M. C., Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Meat and Meat Products, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 2710-2715.
- Komprda T., Smělá D., Pechová P., Kalhotka L., Štencl J., Klejdus B., Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages, *Meat Sci.* 67 (2004) 607–616.
- Krause I., Bockhardt A., Neckermann H., Henle T., Klostermeyer H., Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dansyl derivatives, *Journal of Chromatography A*, 715 (1995) 67-79.
- Lange J., Wittmann C., Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 276–283.
- Lorenzo J. M., Martínez S., Franco I., Carballo J., Biogenic amine content during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product: Effect of some additives, *Meat Sci.* 77 (2007) 287–293.
- Latorre-Moratalla M.L., Veciana-Nogués T., Bover-Cid S., Garriga M., Aymerich T., Zanardi E., Ianieri A., Fraqueza M.J., Patarata L., Drosinos E.H., Lauková A., Talon R., Vidal-Carou M.C., Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries, *Food Chem.* 107 (2008) 912–921.
- Malle P. & M. Vallé, Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *Journal of AOAC International*; Vol.79, (1996) N°1:43-49.
- Miguélez-Arrizado M.J., Bover-Cid S., Latorre-Moratalla M.L., Vidal-Carou M.C., Biogenic amines in Spanish fermented sausages as a function of diameter and artisanal or industrial origin, *J. Sci. Food Agric.* 86 (2006)549–557.
- Min Joong-Seok, Lee Sang-Ok, Jang A., Jo C., Lee M., Irradiation and organic acid treatment for microbial control and the production of biogenic amines in beef and pork, *Food Chem.* 104 (2007) 791–799.

- Moret S., Conte L.S., High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *J. Chromatogr. A* 729 (1996) 363-369.
- Önal A., A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chem.* 103 (2007) 1475-1486.
- Parente E., Martuscelli M., Gardini F., Grieco S., Crudele M.A., Suzzi G., Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy, *J. Appl. Microbiol.* 90 (2001) 882-891.
- Patsias A., Chouliara I., Paleologos E.K., Savvaidis I., Kontominas M.G., Relation of biogenic amines to microbial and sensory changes of precooked chicken meat stored aerobically and under modified atmosphere packaging at 4°C, *Eur. Food Res. Technol.* 223 (2006) 683-689.
- Paulsen P., Bauer F., Vali S., Biogenic amines in fermented sausage- Methods for the determination of biogenic amines, *Fleischwirtschaft* 77(5) (1997) 450-452.
- Pircher A., Bauer F., Paulsen P., Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses, *Eur. Food Res. Technol.* 226 (2007) 225- 231.
- Ribani M., Bottoli C.B.G., Collins C.H., Jardim I.C.S.F., Melo L.F.C., Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos, *Quim. Nova* 27 (2004) 771-780.
- Roseiro C., Santos C., Sol M., Silva L., Fernandes I., Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added, *Meat Sci.* 74 (2006) 557-563.
- Ruiz-Capillas C., Carballo J., Colmenero F. J., Biogenic amines in pressurized vacuum-packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions, *Meat Sci.* 75 (2007) 397-405.
- Shalabi, A.R., Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research Internation* 29 (1996) 675-690.
- Suzzi G., Gardini F., Biogenic amines in dry fermented sausages: a review, *Int. J. Food Microbiol.* 88 (2003) 41-54.
- Vidal-Carou M.C., Latorre-Moratalla M.L., Bover-Cid S., Biogenic Amines. In *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis* (2009) Taylor & Francis.
- Vinci G., Antonelli M.L., Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. *Food Control* 13 (2002) 519 - 524.
- Virgili R., Sacconi G., Gabba L., Tanzi E., Bordini C. S., Changes of free amino acids and biogenic amines during extended ageing of Italian dry-cured ham, *LWT* 40 (2007) 871-878.