

# **Determinação expedita de aminos biogénicas em cogumelos por TLC**

**Susete Amélia da Silva Coelho**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para  
obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por

**Doutora Maria de Fátima Alves Pinto Lopes da Silva**

**Doutor Luís Avelino Guimarães Dias**

**Bragança**

**2012**

À minha família

# AGRADECIMENTOS

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

À Professora Doutora Maria de Fátima Silva, orientadora da presente dissertação, pela inestimável ajuda na definição do objeto de estudo, pela disponibilidade, organização, empenho, sabedoria, compreensão, exigência e, por toda a atenção, incentivo, correções, opiniões e sugestões.

Ao Professor Doutor Luís Dias, pela co-orientação deste trabalho, por toda a disponibilidade manifestada para com o mesmo, pela ajuda e interesse demonstrados, pelo empenho, pela exigência e rigor, pela incansável orientação científica, pela revisão crítica do texto, pelos proveitosos comentários, esclarecimentos, opiniões e sugestões, pela acessibilidade, cordialidade, e pelo interesse evidenciado.

A todos os meus amigos, que me acompanharam ao longo de todo o percurso académico pelo apoio, carinho e incentivo.

Aos meus pais e irmão, pela dedicação, pelo incondicional apoio, pela compreensão, pela paciência, pelo incentivo e pela ajuda imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado, pela compreensão, pela paciência, pelo apoio e dedicação que sempre demonstrou.

A todos o meu “Muito Obrigado”

# RESUMO

A presença de aminas biogénicas nos alimentos é um ponto crítico da segurança alimentar pela sua ligação a casos de intoxicações alimentares, sendo por isso importante testar e otimizar novas metodologias analíticas para a deteção e quantificação destes compostos.

Neste trabalho, pretendeu-se otimizar uma metodologia baseada na técnica de cromatografia em camada fina para analisar 7 aminas biogénicas: cadaverina, espermina, espermidina, putrescina, tiramina, 2-feniletilamina e histamina.

Numa primeira fase, testou-se a eficácia de separação de três eluentes distintos, tendo-se selecionado o eluente clorofórmio: éter diétilico: trietilamina (40:10:10) porque permitiu melhor resolução entre os picos das aminas biogénicas. Posteriormente, avaliou-se o desempenho da metodologia analítica relativamente à calibração de cada amina biogénica para a análise quantitativa.

Os coeficientes de correlação (R) obtidos para a maioria das aminas biogénicas foi superior a 0,99, exceto na calibração da 2-fenileilamina cujo  $R=0,977$ .

Os limites de deteção situaram-se entre 2,6 mg/L (tiramina) e 5,8 mg/L (2-feniletilamina), enquanto os limites de quantificação se situam entre 7,9 mg/L (tiramina) e 17,6mg/L (2-feniletilamina).

Finalmente, aplicou-se o método otimizado em amostras comerciais do cogumelo de cultivo *Pleurotus ostreatus*, em fresco. Estabeleceu-se um procedimento apropriado para a extração das aminas biogénicas nesta matriz e avaliou-se a presença de aminas biogénicas nas amostras de cogumelos conservados à temperatura ambiente ao longo de 8 dias. Neste estudo foram encontrados 4 compostos, três dos quais desconhecidos suspeitando tratar-se de aminas biogénicas. A amina biogénica que foi detetada e quantificada nas amostras de cogumelos foi a espermidina.

Palavras-chave: Aminas biogénicas; cromatografia em camada fina; cogumelos; fluorescência, cloreto de dansilo.

# ABSTRACT

The presence of biogenic amines in foods is a critical issue of food safety due to its links with cases of food poisoning, being important to test and optimize new analytical methods for detection and quantification of these compounds.

In this work it was intended to optimize a methodology based on the technique of thin layer chromatography to analyze seven biogenic amines: cadaverine, spermine, spermidine, putrescine, tyramine, 2-phenylethylamine and histamine.

Initially, it was tested the efficacy of separation of three different eluents, being selected the chloroform: diethyl ether: triethylamine (40:10:10) eluent because it allowed better resolution between the biogenic amines peaks. Subsequently, it was evaluated the analytical methodology performance of calibration of each biogenic amine for quantitative analysis.

The correlation coefficients (R) obtained for most of the biogenic amines was higher than 0.99, except in the calibration of 2-phenylethylamine, with  $R = 0.977$ . The limits of detection ranged from 2.6 mg/L (tyramine) and 5.8 mg/L (2-phenylethylamine), while the quantification limits are between 7.9 mg/L (tyramine) to 17.6 mg/L (2-phenylethylamine).

Finally, the optimized method was applied in fresh commercial samples of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. It was established a suitable procedure for the extraction of biogenic amines in this matrix and carried out the analysis of the biogenic amines in mushrooms samples stored at room temperature over 8 days. In this study, four compounds were detected, three of which are unknown although suspected to be biogenic amines. The biogenic amine that was detected and quantified in the mushroom samples was the spermidine.

Keywords: Biogenic amines, thin layer chromatography, mushrooms, fluorescence, dansyl chloride.

# ÍNDICE GERAL

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	xi
CAPÍTULO 1.....	1
ENQUADRAMENTO TEÓRICO.....	1
1.1 FUNGOS, COGUMELOS E SUA CLASSIFICAÇÃO.....	2
1.2 COGUMELOS COMESTÍVEIS E SEU INTERESSE NA ALIMENTAÇÃO.....	2
1.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COGUMELOS <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> .....	4
1.3.1 Aspetos físicos.....	5
1.3.2 Aspetos nutricionais.....	6
1.4 AMINAS BIOGÉNICAS.....	7
1.4.1 Origem e classificação.....	7
1.4.2 Aminas e poliaminas.....	9
1.4.3 Presença nos alimentos: aspetos de segurança alimentar.....	9
1.4.4 Metodologias analíticas para a sua determinação.....	12
1.5 CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA (TLC).....	13
1.5.1 Identificação de compostos.....	14
1.5.2 Quantificação de compostos.....	15
1.5.3 Derivatização.....	16
1.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	16
1.7 OBJETIVOS.....	18
CAPÍTULO 2	
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE <i>P. OSTREATUS</i> .....	21

2.2 EQUIPAMENTOS .....	22
2.3 MATERIAL E REAGENTES .....	22
2.4 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES .....	23
2.5 TRATAMENTO DA AMOSTRA .....	25
2.5.1 Processo de Extração .....	25
2.5.2 Processo de Derivatização .....	25
2.6 PROCESSO CROMATOGRÁFICO .....	26
2.6.1 Preparação das placas .....	26
2.6.2 Aplicação das amostras e das soluções padrão .....	26
2.6.3 Desenvolvimento das placas .....	27
2.7 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA .....	29
CAPÍTULO 3	
APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	31
3.1 SELEÇÃO DO ELUENTE E IDENTIFICAÇÃO DAS AMINAS BIOGÉNICAS .....	32
3.1.1 Separação das 7 aminas biogénicas por TLC .....	38
3.2 ANÁLISE QUANTITATIVA .....	40
3.2.1 Mistura de padrões .....	41
3.3 DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> EM FRESCO .....	47
3.3.1 Quantificação das aminas biogénicas em cogumelos <i>P. Ostreatus</i> .....	49
CONCLUSÕES .....	52
Referências Bibliográficas .....	54
Anexo .....	60

# ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional de cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	6
Tabela 2 - Teor de minerais da espécie <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	7
Tabela 3 - Aminoácidos essenciais presentes em cogumelos <i>Pleurotus</i> .....	7
Tabela 4 - Estrutura de várias amins biogénicas.....	8
Tabela 5 - Sintomas e efeitos farmacológicos causados pela ingestão de alimentos com teores elevados de amins biogénicas .....	11
Tabela 6 - Fases estacionárias mais utilizadas em TLC. ....	14
Tabela 9 - Equipamento usado neste estudo.....	22
Tabela 7 - Condições ótimas de armazenamento das amins biogénicas e do agente derivatizante em estudo .....	22
Tabela 8 - Massa molar, grau de pureza e fabricante dos reagentes usados neste estudo	23
Tabela 10 - Soluções padrão de calibração .....	24
Tabela 11 - Eluentes testados no estudo.....	32
Tabela 12 - Fatores de retenção dos 3 eluentes testados .....	38
Tabela 13 - Valores do fator de retenção médios das 7 amins biogénicas usando o eluente escolhido .....	39
Tabela 14 - Concentração de cada amina biogénica (mg/L) na solução mãe, nas soluções padrão de mistura de calibração (P1 a P7) e na SCQ. ....	41
Tabela 15 - Retas de calibração de cada AB ensaiada .....	44
Tabela 16 - Limites de deteção e quantificação no estudo do desempenho do método estabelecido para análise de AB por TLC .....	45
Tabela 17 - Exatidão e precisão obtidos com uma SCQ no estudo do desempenho do método de estabelecido para análise de AB por TLC .....	46
Tabela 18 - Áreas dos compostos detetados e respetivos tempos de retenção .....	49
Tabela 19 - Concentração apresentada pela espermidina ao longo dos 8 dias de estudo	50

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> em diferentes estágios de desenvolvimento (Silva, 2009) .....	6
Figura 2- Representação de uma placa de TLC e das medidas a considerar na determinação do Fr. A (antes da eluição) B (depois da eluição). .....	15
Figura 3- Estrutura química do cloreto de dansilo .....	16
Figura 4- Corte dos cogumelos frescos em pequenos pedaços .....	21
Figura 5- Microseringa e placa de TLC, com pontos marcados a lápis para aplicação das diferentes soluções.....	26
Figura 6- Representação da câmara cromatográfica no decorrer do desenvolvimento da placa.....	27
Figura 7- Sistema utilizado para visualizar e fotografar as placas de TLC .....	28
Figura 8- Fotografia de uma placa de TLC obtida sob a luz UV a 365nm .....	29
Figura 9- Barra de ferramentas do programa Image J .....	29
Figura 10- Imagem obtida na escala dos cinzentos após tratamento no Image J .....	30
Figura 11- Densitograma obtido para uma secção selecionada na placa de TLC .....	30
Figura 12- Fotografia, na escala de cinzentos, da separação de 5 AB por TLC com os 3 eluentes testado.....	34
Figura 13- Densitograma para o padrão cadaverina para os 3 eluentes testados .....	35
Figura 14- Densitograma para os 5 padrões para os 3 eluentes testados; CD* - Composto Desconhecido .....	37
Figura 15- Identificação dos 7 padrões em estudo numa placa de TLC. Cada solução padrão individual está colocada em duplicado, em dois pontos sucessivos.....	39
Figura 16- Fotografia, escala de cinzento, das soluções padrão de mistura usadas .....	41
Figura 17- Densitograma típico da separação das 7 aminas biogénicas usando o <i>Image J</i> (solução padrão P3) .....	42
Figura 18- Densitograma obtido para a secção selecionada na placa de TLC referente ao composto putrescina .....	43
Figura 19- Reta de calibração obtido para a putrescina .....	44
Figura 20- Placa representativa das aminas biogénicas encontradas em cogumelos <i>P.ostreatus</i> em fresco; T- tiramina, E- espermina, C-cadaverina .....	47

Figura 21- Evolução das áreas relativas das possíveis AB presentes nos extratos de *P. ostreatus* ao longo dos 8 dias de conservação à temperatura ambiente..... 50

# ABREVIATURAS

**AB** - Aminas biogénicas

**CV%** – Coeficiente de variação percentual

**DPR%** – Desvio padrão relativo percentual

**ELISA**- Enzyme Linked Immuno Sorbente Assay

**Eq** - Equação

**Fr** – Fator de retenção

**GC** - Cromatografia gasosa (abreviatura de “Gas Chromatography”)

**HPLC** - Cromatografia líquida de alto desempenho (abreviatura de “High Performance Liquid Chromatography”)

**ICH** - International Conference on Harmonisation

**LD** - Limite de deteção

**LQ** - Limite de quantificação

**SCQ** - Solução de Controlo de Qualidade

**TCA** - Ácido tricloroacético

**TLC**- Cromatografia de camada fina (abreviatura de “thin-layer chromatography”)

**UV** – Ultravioleta



# Capítulo 1

## Enquadramento teórico

---

## 1.1 FUNGOS, COGUMELOS E SUA CLASSIFICAÇÃO

Das cerca de 70.000 espécies classificadas como fungos, os cogumelos são a mais conhecida, a maioria destas não são vivíveis a olho nu, nuns casos por serem microscópicos e noutros por viverem no interior do substrato, e destes, só alguns têm frutificações grandes: são os macromicetas. São estes os que produzem cogumelos, vivem, diretamente na terra ou sobre madeira, de outros fungos, e em certos animais. Podem-se encontrar em qualquer tipo de substrato (Martins, 2004).

Os fungos em geral, e os que produzem cogumelos em particular, têm caracteres próprios, diferentes dos vegetais e, em certa medida, mais semelhantes aos dos animais (Martins, 2004).

Após serem enquadrados durante longos anos entre os vegetais, os cogumelos são hoje colocados num reino autónomo denominado Reino *Fungi*, devido às suas características peculiares (Martins, 2004; Trabulsi, 1991).

Os fungos podem ser designados como parasitas quando colonizam matéria orgânica viva, como sapróbios quando colonizam matéria orgânica em decomposição (nesta categoria estão inseridos os cogumelos comestíveis *Agaricus* e *Pleurotus*), ou ainda como simbioses quando se associam a outro ser vivo, estabelecendo uma relação harmónica com troca de favores (Bononi *et al.*, 1999).

Os cogumelos são a parte visível de certos fungos, o “fruto” portador de esporos necessários para se reproduzir. Neste tipo de fungos, a parte vegetativa é formada por filamentos (hifas) que crescem quase continuamente no interior ou sobre o substrato, e as hifas, em conjunto, formam o micélio (Martins, 2004).

Os fungos são classificados em vários grupos de acordo com uma série de características, principalmente em relação às suas microestruturas, reprodução sexuada e assexuada, especializações de acordo com o modo de vida, enzimas produzidas, entre outras (Bononi *et al.*, 1999).

## 1.2 COGUMELOS COMESTÍVEIS E SEU INTERESSE NA ALIMENTAÇÃO

Os cogumelos comestíveis fazem parte de dois grandes grupos: os ascomicetos (*Morchella* e *Peziza*) e os basidiomicetos (*Agaricus* e *Pleurotus*) (Bononi *et al.*, 1999).

A literatura especializada cita aproximadamente 2.000 espécies potencialmente comestíveis, todavia, cerca de 25 delas são cultivadas comercialmente sendo normalmente utilizadas na alimentação humana. É possível a cultura de algumas destas espécies designadamente, *Agaricus bisporus*, *Agaricus campestris*, *Lentinus edodes* e *Pleurotus ostreatus* (Furlani e Godoy, 2007; Urban *et al.*, 2001).

Apesar de sermos dos países sem legislação específica que regule o comércio dos cogumelos, encontramos à venda espécies cultivadas sem risco para a saúde pública e interessantes sob o ponto de vista alimentar, como são o *Pleurotus ostreatus* (“repolgas”), o *Lentinula edodes* (“shiitake”), ambos com propriedades medicinais (ajudam a baixar o colesterol), *Pleurotus eryngii*, (“setas de cardo”), *Lepista nuda* (“pé azul”) e *Agaricus bisporus* (“cogumelos de Paris”), entre outros (Martins, 2004).

Estes macrofungos têm sido muito utilizados na alimentação humana desde sempre, despertando o interesse de investigadores interessados no estudo das suas propriedades nutritivas e medicinais. São também considerados alimentos terapêuticos, algumas espécies demonstram ter ação imunomoduladora, isto é, atuam ao nível do sistema imunitário, condicionam a resposta imunológica, com efeito anti-tumoral ou imunossupressor (Martins, 2004). São também usadas para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares como hipertensão, hipercolesterolemia, cancro e diabetes (Azevedo, 1982; Helm *et al.*, 2009). Compostos antioxidantes foram encontrados em espécies como *Lentinus edodes* e *Pleurotus ostreatus* (Yang *et al.*, 2002).

Quando comparados com outros produtos de origem vegetal, os cogumelos são muito ricos em proteínas, vitaminas, minerais e teor em água, além disso são pobres em calorias, sal, lípidos, isentos de açúcar, amido e colesterol, características estas que os tornam um suplemento nutricional e um dietético ideal (Rai e Paul, 2007).

Relativamente à toxicidade de cogumelos comestíveis e medicinais, as informações são bastante limitadas. Os riscos que a ingestão de cogumelos pode trazer à saúde são devidos à presença de certos contaminantes existentes no meio ambiente, sendo os cogumelos utilizados como biomarcadores da poluição ambiental (Taveira e Novaes, 2007).

A contaminação de cogumelos pode ocorrer durante o seu processamento. Para estes serem comercializados em conservas devem sofrer adição de algumas substâncias (Rodrigo *et al.*, 1999). De acordo com o *Codex Alimentarius* podem ser utilizados como aditivos em cogumelos os ácidos acético, láctico, cítrico e ascórbico, sendo os limites na

concentração para o ácido acético a dosagem máxima de 20g/Kg e para os ácidos láctico e cítrico a dosagem máxima de 5g/Kg, separadamente ou em associação (Moda *et al.*, 2005).

A degradação de cogumelos comercializados frescos pode representar um risco para a saúde, por apresentarem um curto tempo de vida útil, limitando-se a um a três dias, à temperatura ambiente, e sob refrigeração, cerca de oito a dez dias.

O processo de tratamento após a colheita dos cogumelos deve ser executado o mais rápida e eficientemente possível, devido à sua fácil deterioração (Azevedo, 1982).

A qualidade dos cogumelos é refletida tendo em conta diversos parâmetros tais como a cor, textura, estágio de desenvolvimento e contagem microbiana. O seu deficiente manuseamento pode levar à contaminação por coliformes fecais e *Escherichia coli*, sendo possível também ocorrer a contaminação por *Clostridium botulinum* (Gonzalez *et al.*, 2000).

### **1.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COGUMELOS *PLEUROTUS OSTREATUS***

O nome *Pleurotus* vem do grego “pleuro” que significa formado lateralmente ou em posição lateral, referindo-se à posição lateral da estipe em relação ao píleo (Stamets e Chilton, 1983).

Pertencendo à ordem *Agaricales* e à família *Pleurotaceae*, o género *Pleurotus* é amplamente cultivado no mundo todo. Até à década de 70 do século XX, o seu consumo era feito basicamente pela coleta destes cogumelos diretamente da Natureza e a partir de então iniciou-se o cultivo em escala industrial (Mandeel *et al.*, 2005; Bononi *et al.*, 1999).

Foram descritas mais de 1.000 espécies de *Pleurotus* no mundo, somente 50 das mesmas são reconhecidas como válidas para este género. A dificuldade de proceder à sua identificação taxonómica prende-se com o facto de existir uma ampla variedade de espécies distribuídas por todo o mundo (Guzman, 2000). Para além das suas propriedades gastronómicas, o género representa o grupo de cogumelos comestíveis com sabor característico, elevado teor de proteínas e vitaminas, baixa quantidade de lípidos e com propriedades terapêuticas (Breene, 1990; Mandeel *et al.*, 2005).

Algumas espécies de cogumelos, tais como *Pleurotus ostreatus*, *P. florida*, *P. citrinopileatus*, *P. salmoneo-stramineus*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*,

*Flammulina velutipes* e *Grifola*, possuem enzimas extracelulares como lenhina peroxidase, manganês peroxidase e lacases, que podem modificar e degradar a lenhina, possuindo desta forma, a capacidade de crescer em troncos de árvores vivas ou mortas (Martinez *et al.*, 2001).

Esta espécie apesar de se adaptar ecologicamente a diversas condições climáticas, no seu meio natural encontra-se primordialmente como saprófita em zonas temperadas, crescendo em aglomerados de madeira desde que existam condições favoráveis nomeadamente em termos de temperatura e humidade. (Schachter *et al.*, 2005).

Quando cultivada esta espécie, apresenta um ciclo de produção relativamente rápido (apresentando um custo e tecnologia de produção baixos), sendo necessário menos de 30 dias desde o início de seu crescimento vegetativo até a primeira colheita, num total de três ciclos de produção (Stamets, 2000; Mandeel *et al.*, 2005).

São vários os subprodutos que podem ser usados como substrato para o cultivo dos *Pleurotus ostreatus*, o que os torna interessantes em termos de comercialização tais como: folhas de bananeira, cascas de amendoim, trigo, palhas de milho, folhas e bagaço de cana-de-açúcar, farelo de arroz e uma variedade de resíduos lignocelulósicos (Mandeel *et al.*, 2005; Webster e Weber, 2007; Schachter *et al.*, 2005).

### 1.3.1 ASPETOS FÍSICOS

A espécie *Pleurotus ostreatus*, conhecida comumente como “Cogumelo Ostra” (figura 1), na Natureza, possui um chapéu excêntrico convexo, aveludado e com a margem um pouco enrolada, acinzentado ou esbranquiçado com tons azulados, às vezes cor de concha de ostra, glabro e seco, podem apresentar por vezes um diâmetro de 10 ou mais cm; as suas lâminas são esbranquiçadas e bastante estreitas; apresentam um pé muito curto, branco, e piloso; a sua carne é esbranquiçada, não muda de cor, de aroma agradável e sabor suave; habita em apertados tufos, têm duração de Setembro até à chegada da Primavera, vivem em tocos ou troncos vivos de diferentes caducifólias, mais raramente em madeira de coníferas, por vezes mesmo em grande número (Garnweidner *et al.*, 1999).



**Figura 1-** Cogumelos *Pleurotus ostreatus* em diferentes estágios de desenvolvimento (Silva, 2009)

### 1.3.2 ASPETOS NUTRICIONAIS

A crescente popularidade na Europa dos cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus*, deve-se à sua qualidade sensorial e ao seu valor nutritivo. Tal como a grande maioria dos cogumelos comestíveis, *Pleurotus ostreatus* é caracterizada pelo seu baixo valor calórico ( $1510 \text{ kJ kg}^{-1}$  parte edível), tornando-o adequado para o seu consumo numa dieta saudável (Jaworska e Bernas, 2009).

O género *Pleurotus* como outros cogumelos comestíveis, possuem comprovadas propriedades nutricionais, como elevado teor de fibras, quantidades moderadas de proteínas de boa qualidade com a maior parte dos aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas. Na tabela 1, 2 e 3, mostram-se resultados sobre a composição nutricional de cogumelos *Pleurotus ostreatus*, o teor em minerais e em aminoácidos essenciais respetivamente (adotado de Azevedo, 2010).

**Tabela 1-** Composição nutricional de cogumelos *Pleurotus ostreatus*

Componentes	Unidades		
	% m/m, em base seca	% m/m, em base húmida	g/100g de massa seca
Cinzas	11.11	-----	5.58
Hidratos de carbono	28.57	1.86	47.0
Proteínas	37.51	3.8	16.9
Lípidos	1.32	0.13	5.97
Fibras alimentares	21.94	2.17	9.41
Referências	Helm <i>et al.</i> , 2009	Helm <i>et al.</i> , 2009	Bonatti <i>et al.</i> , 2004

**Tabela 2-** Teor de minerais da espécie *Pleurotus ostreatus*

Teor de minerais	% m/m, em base seca
Cobre	0.45
Ferro	2.16
Zinco	1,66
Manganês	0,29
Cálcio	7.63
Magnésio	13.43
Potássio	274.42
Sódio	27.58
Fósforo	158.23
Referência	Helm <i>et al.</i> ,2009

**Tabela 3 –** Aminoácidos essenciais presentes em cogumelos *Pleurotus*

Aminoácidos	Unidades			
	g/100g de proteína bruta corrigida	mg/g (peso seco)	g/100g de cogumelo	mg/100g (peso fresco)
Leucina	6.8	12.2	6.54	139
Histidina	1.7	15.0	3.77	65
Arginina	5.3	12.1	10.94	176
Valina	5.5	10.7	4.36	112
Lisina	4.5	9.7	6.30	126
Treonina	4.6	8.5	4.98	106
Isoleucina	4.2	6.6	4.06	82
Fenilalanina	3.7	7.2	4.16	111
Tirosina	3.0	6.0	3.55	219
Metionina	1.5	4.6	1.54	35
Cisteína	0.4	2.8	1.23	28
Referência	Bano e Rajarathnam., 1988	Hadar e Cohen-Azari., 1986	Manzi <i>et al.</i> , 1999	Mattila <i>et al.</i> , 2002

## 1.4 AMINAS BIOGÉNICAS

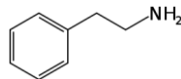
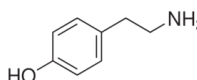
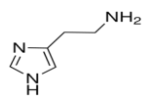
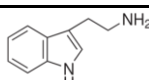


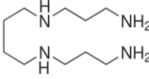
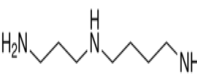
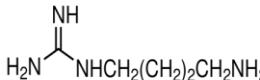
### 1.4.1 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO

As aminas biogénicas são compostos orgânicos nitrogenados, de natureza básica, com baixo peso molecular que ocorrem naturalmente em microrganismos, plantas e animais, como consequência do seu metabolismo (Santos, 1996). Estes compostos possuem atividade biológica participando em importantes processos fisiológicos, tais

como, controlo das funções dos ácidos nucleicos, divisão celular, síntese proteica, estabilização de membranas (putrescina, espermidina e espermina); funções no sistema nervoso; controlo da pressão sanguínea (histamina, tiramina e 2-feniletilamina) e mediador primário do sistema de respostas alérgicas (histamina) (Halász *et al.*, 1994).

As amins biogénicas são designadas por amins biogénicas devido à sua origem biológica e em função da sua estrutura química podem ser agrupadas segundo (Santos, 1996) como: alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromáticas (tiramina e 2-feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina) como se mostra na tabela 4.

**Tabela 4** – Estrutura de várias amins biogénicas

	Composto	Estrutura	Cor apresentada na fluorescência <sup>a</sup>
Monoaminas aromática	2-Feniletilamina		Azul
	Tiramina		Amarelo
Aminas heterocíclicas	Histamina		Amarelo/laranja
	Triptamina		Azul/ verde
Diaminas alifáticas	Cadaverina		Azul
	Putrescina		Azul
Poliaminas alifáticas	Espermina		Azul/ verde
	Espermidina		Azul/ verde
	Agmatina		Azul/ verde

<sup>a</sup> adaptado de (Vidal-Carou *et al.*, 2009).

As aminas biogénicas são formadas predominantemente pelo processo de descarboxilação dos aminoácidos livres durante o armazenamento e tratamento do material biológico sob condições inapropriadas (Mariné-Font *et al.*, 1995).

Este processo pode ocorrer por duas vias: ou através de enzimas descarboxilase endógenas naturalmente presentes nos alimentos, ou através de enzimas descarboxilase exógenas, as quais são libertadas por microrganismos associados aos alimentos. A produção endógena de aminas biogénicas é significativamente menor em relação à exógena. Ambas têm efeitos sobre a saúde humana sendo prejudiciais em determinadas concentrações (Santos, 1996; Kalač *et al.*, 2009).

#### **1.4.2 AMINAS E POLIAMINAS**

Durante a década de 1990 o tradicional grupo das aminas biogénicas foi dividido em dois subgrupos, com base no diferente modo de formação e funções biológicas. Assim sendo, consideram-se as monoaminas (histamina, tiramina, triptamina, 2-feniletilamina) e as diaminas (putrescina, cadaverina, agmatina) no primeiro grupo e as poliaminas num segundo grupo, as quais são determinadas principalmente como componentes naturais de todos organismos vivos, com efeitos positivos e negativos sobre a saúde humana sob diferentes condições (Kalač *et al.*, 2009).

A putrescina, espermina, e a espermidina são classificadas como poliaminas biologicamente ativas; a putrescina pode ser também classificada como poliamina devido ao papel que desempenha como precursora de algumas “verdadeiras” poliaminas (Kalač *et al.*, 2009).

#### **1.4.3 PRESENÇA NOS ALIMENTOS: ASPETOS DE SEGURANÇA ALIMENTAR**

As aminas biogénicas são produzidas em vários alimentos e bebidas, tanto em alimentos fermentados como em não fermentados, principalmente pela atividade de bactérias putrefativas.

As aminas biogénicas podem estar presentes numa vasta gama de alimentos tais como, chocolate, queijo curado, vinho tinto, cerveja, peixes e produtos à base de peixe (Vidal-Carou *et al.*, 2009; Kalač *et al.*, 2009).

A determinação destes compostos assume um papel importante, não só do ponto de vista da sua toxicidade, como devido ao facto de poderem funcionar como bons indicadores ao nível da contaminação microbiológica, e refletirem a qualidade higiénica dos alimentos (Saaïd *et al.*, 2009).

A presença elevada de determinadas aminas biogénicas pode indiciar o uso de matérias-primas de fraca qualidade ou contaminações devido a deficientes condições no processamento e armazenamento dos alimentos. De forma a evitar estas contaminações, os alimentos devem durante toda a sua cadeia de produção e distribuição cumprir com todos os requisitos a fim de evitar o crescimento microbiano indesejável.

As aminas biogénicas ingeridas com os alimentos têm, em princípio, menores efeitos tóxicos, uma vez que o nosso corpo é capaz de as metabolizar ao nível do trato-intestinal e a nível hepático, contudo em alguns casos, os mecanismos que o organismo dispõe podem ser insuficientes quando o indivíduo tem uma atividade enzimática reduzida quer por hereditariedade ou patologias adquiridas (Mariné-Font *et al.*, 1995), podendo assim comprometer a saúde humana após a sua ingestão e levando a variados sintomas, dependendo do tipo de amina biogénica. Na tabela 5 apresentam-se os sintomas e efeitos farmacológicos associados à ingestão de elevados níveis de aminas biogénicas em alimentos (Shalaby, 1996; Santos, 1996; Önal, 2007).

A determinação da dose tóxica das aminas biogénicas é difícil de estabelecer uma vez que depende de fatores individuais e da presença de outras aminas biogénicas. Assim sendo, os limites têm sido até agora esporádicos, sendo estes aplicados somente a indivíduos saudáveis (Kalač *et al.*, 2009).

Com base em alguns estudos foi proposto para a histamina, a qual tem sido apontada como causadora de diversos fenómenos de intoxicação alimentar, um limite de 100 mg/kg de alimento. Pondera-se que na presença de outras aminas biogénicas tais como a cadaverina, putrescina e tiramina, a histamina possa refletir uma maior toxicidade (Shalaby, 1996; Santos, 1996). De igual forma, valores de tiramina entre 100-800 mg/kg e de feniletilamina acima de 30 mg/kg, nos alimentos, são considerados tóxicos para a ingestão de uma porção de  $\approx 200$  g alimento (Santos, 1996). Sabe-se que a agmatina, a espermina, a espermidina ou as aminas biogénicas terciárias podem ainda reagir com nitritos formando nitrosaminas carcinogénicas, constituindo um potencial risco para a saúde humana (Shalaby, 1996).

**Tabela 5** – Sintomas e efeitos farmacológicos causados pela ingestão de alimentos com teores elevados de aminas biogénicas

Amina	Precursor	Sintomas Possíveis	Efeitos farmacológicos
Histamina	Histidina	Cutâneos: erupção, urticária, edema e inflamação localizada; Gastrointestinais: náuseas, diarreia e contrações abdominais; Outros sintomas incluem hipotensão, dores de cabeça, palpitações, formigamento e, em casos mais severos, sensação de queimadura, broncoespasmos e dificuldade respiratória	Vasodilatação, libertação de adrenalina; estimula os neurónios sensoriais e motores; controlo da secreção ácida gástrica; mediador primário da resposta alérgica imediata
Tiramina	Tirosina	Causa aumento das pupilas, lacrimação e salivação; Dores de cabeça e enxaqueca; Hipertensão.	Vasoconstrição periférica; aumento do débito cardíaco, da respiração e dos níveis de açúcar no sangue
Putrescina	Ornitina	Paresia das extremidades	Diminuição da pressão sanguínea, bradicardia; potencia a toxicidade das outras aminas
Cadaverina	Lisina		
2- Feniltilamina	Fenilalanina	Dores de cabeça, enxaqueca e Hipertensão	Vasoconstrição; libertação da noradrenalina a partir do sistema nervoso parassimpático; Aumento da pressão sanguínea cefaleia
Triptamina	Triptofano	Hipertensão	Aumento da pressão sanguínea

A formação de elevadas quantidades de amins biogénicas está relacionada com a disponibilidade de aminoácidos livres (embora, nem sempre levem à formação de amins biogénicas), à presença de microrganismos descarboxilase positivos, às condições favoráveis ao crescimento bacteriano e à atividade microbiana (Lange e Wittmann, 2002, Innocente *et al.*, 2007).

Deve ter-se em atenção que certas amins biogénicas podem ser tóxicas para o Homem quando presentes no alimento em concentrações significativas ou mesmo quando o mecanismo natural para o catabolismo de uma ou mais amins biogénicas seja inibido ou geneticamente deficiente. É pois importante que haja metodologias analíticas rápidas e simples de implementar para analisar amins biogénicas nos alimentos para controlo da sua qualidade e assim evitar situações de toxicidade para o consumidor.

#### **1.4.4 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A SUA DETERMINAÇÃO**

Na área alimentar cada vez mais são testados/melhorados novos métodos para a determinação de ínfimos constituintes indesejáveis nos alimentos suscetíveis de prejudicar a saúde do consumidor. Desta forma, exige um esforço da parte da comunidade científica em desenvolver técnicas analíticas promissoras, capazes de detetar e, se possível, quantificar essas mesmas substâncias.

A determinação de amins biogénicas nos mais diversos alimentos prende-se não só com o facto de estes compostos serem potencialmente tóxicos como também poderem ser potenciais indicadores da falta de qualidade dos alimentos (Önal, 2007).

A correta quantificação das amins biogénicas é uma operação analítica com um certo grau de dificuldade devido a vários aspetos tais como: o seu carácter polar; a ausência de propriedades intrínsecas dos compostos que possibilitem a sua deteção diretamente por métodos físico-químicos de aplicação corrente, como é o caso de métodos espectrofotométricos, fluorimétricos ou electroquímicos; a extrema complexidade das matrizes; as baixas concentrações em que se encontram estes compostos nas amostras; a presença potencial de compostos interferentes, como diversos aminoácidos com semelhanças estruturais às amins biogénicas; e ainda a presença simultânea de amins biogénicas estruturalmente muito diferentes no mesmo extrato (Shalaby, 1996; Fernandes, 2001; Önal, 2007).

Pela sua elevada resolução, sensibilidade e versatilidade, os procedimentos cromatográficos são os métodos mais utilizados na deteção de amins biogénicas (Vidal-Carou *et al.*, 2009).

São várias as técnicas baseadas em fluorescência para analisar as amins biogénicas nos alimentos, nomeadamente: **cromatografia em camada fina (TLC)**, cromatografia de fase gasosa (GC), electroforese capilar (CE), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e ensaios bioquímicos (Santos, 1996; Shalaby, 1996; Önal, 2007).

As amins biogénicas podem ainda ser detetadas recorrendo a métodos bioquímicos de análise, como sendo, testes imunológicos de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbente Assay) e testes realizados com culturas bacterianas descarboxilase-oxidativas em tirosina-agar (AOAC, 1995).

A cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com deteção por fluorescência é a técnica de excelência para a análise deste tipo de compostos. Contudo, as amins biogénicas não exibem uma forte fluorescência, não podendo por isso mesmo ser detetadas de forma direta.

A cromatografia de fase gasosa (GC) não é normalmente aplicada para a determinação de amins biogénicas devido à natureza destas serem não voláteis.

A aplicação de somente um único procedimento cromatográfico não é fiável para a determinação simultânea das amins biogénicas devido à ausência de um cromóforo ou fluróforo comum na sua estrutura (Paleólogos *et al.*, 2003).

## **1.5 CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA (TLC)**

A Cromatografia de Camada Fina (CCF) ou Thin-Layer Chromatography (TLC), é constituída por uma fase estacionária, um sólido (sílica, alumina, celulose), depositado em camada fina e uniforme sobre um suporte sólido inerte (alumínio ou vidro), e por uma fase móvel sendo um líquido de baixa viscosidade que por capilaridade elui através da fase estacionária.

É uma técnica de separação, rápida (as separações podem ser obtidas em tempos relativamente curtos), não requer um equipamento especial ou sofisticado, é pouco dispendiosa e pode ser aplicada a um grande número de compostos existentes em matrizes complexas. A sua principal desvantagem é ser uma técnica

qualitativa/semiquantitativa – colocação de amostras em quantidades conhecidas e quantificação por comparação (Touchstone, 1992; Shalaby, 1999).

Existem vários tipos de adsorventes utilizados em TLC, em função da polaridade (polares ou apolares), força de interação com os solutos (fortes, médios ou fracos) e das suas propriedades ácidas ou básicas. Na tabela 6 indicam-se as principais fases estacionárias que se podem usar em TLC (Spangenberg, 2011).

**Tabela 6-** Fases estacionárias mais utilizadas em TLC.

<b>Principais fases estacionárias em TLC</b>
Óxido de alumínio
Silicato de magnésio
Sílica gel
Camadas de gel de sílica quimicamente ligadas
Celulose
Poliaminas
Resinas de troca iónica
Fases quirais
Camadas com indicadores fluorescentes

A sílica gel é sem dúvida a fase estacionária mais utilizada nos estudos com TLC (matriz inorgânica), devido à sua grande área superficial, propriedades bem definidas, habilidade para adsorver uma enorme quantidade de compostos orgânicos e a possibilidade da sua superfície ser facilmente modificada com inúmeros grupos químicos (Foschiera, 1999).

A escolha da fase estacionária é muito importante neste tipo de cromatografia, assim como a do solvente (ou eluente). Os eluentes fortemente adsorvidos pela fase sólida vão competir com as moléculas de soluto na adsorção, fazendo com que estas se desloquem com facilidade da superfície de adsorção, dando origem a baixos fatores de retenção; pelo contrário, eluentes fracamente adsorvidos por esta superfície originam elevados fatores de retenção dos solutos (Carneiro, 2001).

### **1.5.1 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS**

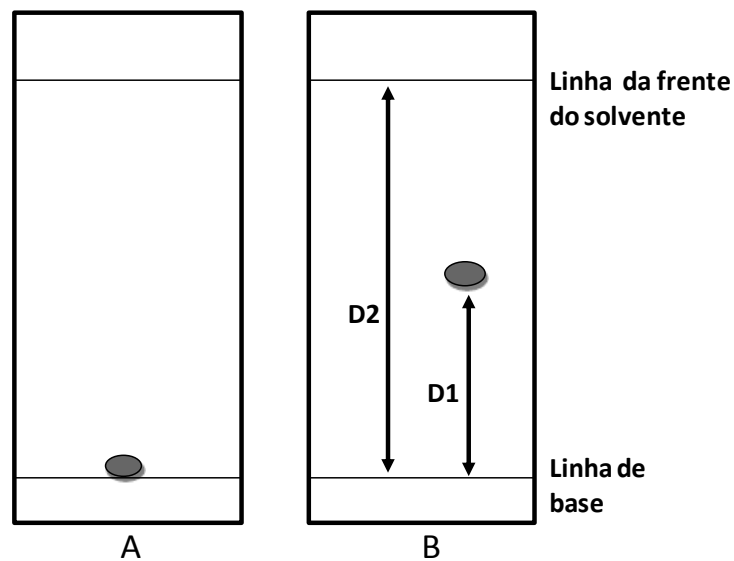
Na figura 2 mostra-se um esquema de uma placa de TLC com indicação da linha de base, onde se marcam os pontos que sinalizam a posição de colocação da amostra a analisar; as manchas no meio da placa de TLC indicam que foi efetuada uma separação; a “frente” do solvente, corresponde à linha onde o eluente chegou no momento da interrupção da eluição.

A análise qualitativa corresponde à identificação dos compostos, sendo efetuada através do fator de retenção (Fr). Este, é dado pela razão:

$$Fr = \frac{\text{Distância da mancha à linha de base (D1)}}{\text{Distância da frente do solvente à linha de base (D2)}} \quad \text{Eq.1}$$

As distâncias D1 e D2 estão assinaladas esquematicamente na figura 2.

Exemplificando com os analitos em causa neste trabalho, os valores de Fr identificam as manchas das aminas biogénicas na placa de TLC. O valor de Fr é característico de uma dada espécie química em qualquer tipo de separação, e algumas vezes, este valor é usado para a identificação qualitativa de uma espécie desconhecida. (Vogel., 1986).



**Figura 2-** Representação de uma placa de TLC e das medidas a considerar na determinação do Fr. A (antes da eluição) B (depois da eluição).

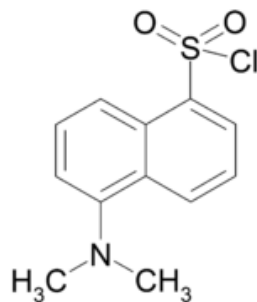
### 1.5.2 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

Para se proceder à quantificação são usadas soluções padrão de calibração, que se aplicam na placa TLC, e a partir das manchas dos compostos puros retiram-se os valores das áreas respetivas. Com estas áreas e concentrações conhecidas, obtêm-se curvas de calibração que permitem quantificar os analitos.

### 1.5.3 DERIVATIZAÇÃO

Devido à baixa volatilidade das aminas biogénicas, à falta de agentes cromóforos e à melhoria da sensibilidade, usualmente são adotados procedimentos analíticos baseados na formação de derivados fluorescentes, recorrendo a diferentes agentes de derivatização.

Na literatura estão descritos vários agentes derivatizantes, tais como: o ortoftaldialdeído, os cloretos de sulfonilo, os cloretos de carbonilo, a fluorescamina, de entre outros (Fernandes, 2001). Dá-se aqui particular relevância ao grupo dos cloretos de sulfonilo pois neste grupo está inserido o cloreto de dansilo (figura 3), que foi o agente usado neste estudo.



**Figura 3-** Estrutura química do cloreto de dansilo

O cloreto de dansilo tem a capacidade de reagir com aminas biogénicas primárias e secundárias, a pH medianamente alcalino (9,5-10). Os derivados formados são, em regra, estáveis, embora em meio alcalino possa haver hidrólise de alguns deles, o que é particularmente evidente no caso da histamina (Seiler, 1993).

Na extração de aminas biogénicas, diferentes solventes têm sido usados, nomeadamente, os ácidos hidroclorídico, tricloroacético e perclórico, assim como, metanol e outros solventes orgânicos. A extração das aminas biogénicas representa um passo crítico do processo pois pode influenciar negativamente as recuperações analíticas (Vinci e Antonelli, 2002).

## 1.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, é cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e

interpretáveis sobre a amostra, deve sofrer uma avaliação denominada validação (Ribani *et al.*, 2004).

A validação de um método analítico tem como finalidade a avaliação das características do método, o controlo das variáveis que afetam o resultado e a avaliação da incerteza global associada ao método. Para a validação do método de análise de aminas biogénicas efetuou-se o estudo dos parâmetros analíticos: sensibilidade, limite de deteção, limite de quantificação, precisão, e exatidão.

O **limite de deteção (LD)** é a concentração mínima da substância em análise detetada com precisão e exatidão adequada. O seu valor pode ser calculado baseado em parâmetros da curva analítica através da seguinte expressão:

$$LD = \frac{3,3 \times Sb}{a} \quad \text{Eq. 2}$$

onde:  $S_b$  é o desvio padrão da ordenada da origem da equação da reta ou da equação da reta da regressão linear;  $a$  é o declive ou coeficiente angular da curva analítica. Para obter estes dados devem-se usar soluções padrão de calibração com matriz semelhante ou igual às das amostras e com concentrações da substância próximas do limite de deteção (Ribani *et al.*, 2004).

O **limite de quantificação (LQ)** corresponde à concentração da substância a analisar que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. O LQ é calculado usando os mesmos parâmetros definidos no cálculo do limite de deteção (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller., 2005):

$$LQ = \frac{10 \times Sb}{a} \quad \text{Eq. 3}$$

Já a **precisão** avalia a dispersão de resultados obtidos através de uma série de medições repetidas a uma solução em análise. Se as análises forem efetuadas no mesmo dia, no mesmo laboratório e com o mesmo equipamento e técnico, o estudo é sobre a repetibilidade analítica. A precisão é normalmente avaliada usando o valor do desvio padrão relativo (DPR%), também conhecido como coeficiente de variação (CV%).

$$DPR(\%) = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

onde, S é o desvio padrão absoluto, e  $\bar{x}$  é a média aritmética das medições.

Geralmente, métodos que determinam substâncias em macro quantidades requerem um DPR% de  $\leq 5\%$ . Em métodos de análise de quantidades residuais, aceitam-se DPR% até 20%, dependendo da complexidade da amostra (Ribani *et al.*, 2004).

O critério experimental usado na avaliação da precisão foi a repetibilidade. Esta avalia a dispersão dos resultados de medições sucessivas usando o mesmo método sob as mesmas condições de medição, ou seja, usando o mesmo procedimento, com o mesmo técnico e equipamento analítico e usando as mesmas condições experimentais do mesmo laboratório. As repetições devem ser realizadas num curto intervalo de tempo.

A **exatidão** é avaliada pela proximidade entre o resultado de uma análise e o seu valor de referência aceite como verdadeiro. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, está dependente de erros sistemáticos. A ICH (International Conference on Harmonisation) recomenda avaliar a exatidão com um mínimo de nove determinações e contendo no mínimo três níveis de concentração definidos de forma a abranger um intervalo estabelecido. (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

$$Er\% = \frac{|V_{\text{medido}} - V_{\text{esperado}}|}{V_{\text{esperado}}} \times 100 \quad \text{Eq. 5}$$

onde Er% é o erro percentual, e V o valor.

## 1.7 OBJETIVOS

Perante o exposto até agora, sobressai a importância do desenvolvimento de métodos para a deteção das aminas biogénicas visto que, podem estar envolvidas em intoxicações alimentares, ser potenciais indicadores de qualidade higiénica nos mais diversos alimentos e por, nos métodos analíticos existentes, se manter alguma dificuldade na sua adequada identificação e quantificação.

Além disso, e como já foi referido anteriormente, a correta quantificação das aminas biogénicas reveste-se de algum grau de dificuldade devido a aspetos relacionados com as suas características químicas, as baixas concentrações em que geralmente se encontram, a extrema complexidade das matrizes, a presença potencial de interferentes e a presença, no mesmo extrato, de aminas biogénicas estruturalmente muito diferentes (Shalaby, 1996; Fernandes, 2001; Önal, 2007).

Assim, este trabalho teve por objetivos:

1. Otimizar uma metodologia de TLC para separar aminas biogénicas;
2. Validar o método de TLC estabelecido e otimizado para quantificar sete aminas biogénicas;
3. Aplicar o método na quantificação das aminas biogénicas presentes em cogumelos *Pleurotus ostreatus* frescos conservados à temperatura ambiente durante 8 dias.

# Capítulo 2

## MATERIAL E MÉTODOS

---

Neste capítulo apresenta-se a descrição da amostragem efetuada, bem como, o equipamento, os reagentes, a preparação das soluções e os procedimentos usados na análise de amins biogénicas em cogumelos.

## 2.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE *P.OSTREATUS*

No sentido de estabelecer o procedimento de extração das amins biogénicas na matriz em estudo, realizaram-se ensaios analíticos prévios com cogumelos *Pleurotus ostreatus* frescos, que foram cortados em pequenos pedaços para um recipiente devidamente rotulado, e colocados num congelador (-20°C) cerca de 4h; posteriormente com a amostra de cogumelos já congelada, procedeu-se à sua liofilização durante 3 dias para remoção de toda a sua água. De seguida, com uma picadora, reduziu-se a pó.

Nos ensaios definitivos para a identificação e quantificação das amins biogénicas nos cogumelos *Pleurotus ostreatus* – cujos resultados se apresentam no ponto 3.3 - utilizaram-se cogumelos frescos adquiridos num supermercado local e procedeu-se ao seu corte. Imediatamente antes de se sujeitar a toma de amostra a ensaio (extração, derivatização e separação por TLC), esta era sujeita a maceração, o que sucedeu no próprio dia de compra, e após 4, 6 e 8 dias de exposição ao ar e à temperatura ambiente (cerca de 18-20°C).

Para o estudo de validação do método, utilizou-se sempre a mesma amostra de cogumelos comerciais.



**Figura 4** - Corte dos cogumelos frescos

## 2.2 EQUIPAMENTOS

Para proceder a este estudo não foram precisos equipamentos muito sofisticados, sendo uma das vantagens deste método cromatográfico.

Na tabela 7 são apresentados os equipamentos usados neste trabalho.

**Tabela 7-** Equipamento usado neste estudo

Equipamentos	Marca	Modelo
Vortex	Nahita	681
Ultra-sons	Elma	S 60 H (elmasonic)
Lâmpada UV	Vilber Lourmat	VL-6-LC
Estufa	Memmet	Basic
Máquina fotográfica	Canon	Cyber-shot (7,2 MP)
Placas cromatográficas	Macherey - Nagel	Alugram Sil /UV <sup>254</sup>
Balança	Adam Equipment	AAA/L
Microseringa	Hamilton (10 $\mu$ L)	SYR 1701 TLC
Centrífuga	Heraeus	Labofuge 300

## 2.3 MATERIAL E REAGENTES

Os reagentes adquiridos comercialmente são todos de qualidade para análise. Neste estudo foram usados 7 padrões de aminas biogénicas na forma de sais hidroclicóricos: espermina, tiramina, 2- feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina e a espermidina. Como agente derivatizante usado para tornar as aminas biogénicas fluorescentes foi usado o cloreto de dansilo (5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilcloreto).

Todas as aminas biogénicas foram guardadas segundo a indicação do fabricante até ao momento da sua utilização como é apresentado na tabela 8.

**Tabela 8-** Condições ótimas de armazenamento das aminas biogénicas e do agente derivatizante (a.d.) em estudo

Padrão e a.d.	Condições de armazenamento
Espermina	Frigorífico (5°C)
Cadaverina	Temperatura ambiente
2-Feniletilamina	Temperatura ambiente
Tiramina	Frigorífico (5°C)
Espermidina	Congelador (-20°C)
Histamina	Frigorífico (5°C)
Putrescina	Temperatura ambiente
Cloreto de dansilo (a.d.)	Congelador (-20°C)

A informação química geral sobre os reagentes usados neste trabalho, bem como, a marca do fornecedor, estão apresentadas na tabela 9.

**Tabela 9** – Massa molar, grau de pureza e fabricante dos reagentes usados neste estudo

Composto	Massa Molar (g/mol)	Grau de pureza	Fabricante
Espermina	202,34	≥99%	Fluka
Cadaverina	102,18	>98%	Sigma
2-Feniletilamina	121,18	≥98%	Sigma
Tiramina	137,18	≥99%	Fluka
Espermidina	145,25	99%	Sigma
Histamina	111,15	99%	Sigma
Putrescina	161,07	≥98%	Sigma
Cloreto de dansilo	289,75	95%	Sigma
Carbonato de sódio	105,99	99,8%	Panreac
Hidróxido de amónia	35,04	25%	Fluka
Ácido tricloacético	163,39	99,6%	Fisher Scientific
Éter etílico	74,12	99,5%	Panreac
Acetato de etilo	88,11	99,8%	LabScan
Clorofórmio	119,38	99,9%	Fisher Scientific
Trietilamina	101,19	99,5%	Panreac
Metanol	32,04	99,9%	Panreac

## 2.4 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas com material de vidro de calibração de qualidade tipo A.

As soluções usadas neste estudo, bem como, o modo de preparação estão a seguir descritas:

### i) Soluções padrão individuais de aminas biogénicas

Foram preparadas soluções padrão mãe de cada amina biogénica comercial dissolvendo 0,1000 g de cada amina biogénica em 100,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% (solução aquosa).

## ii) Soluções padrão de calibração

As soluções padrão de calibração de aminas biogénicas foram preparadas por mistura de diferentes volumes retirados das soluções padrão mãe individuais, para balões volumétricos aferidos com TCA a 5%, de acordo com os volumes referidos na tabela 10.

**Tabela 10** - Soluções padrão de calibração

Solução padrão	Volume de cada solução mãe (mL)	Volume final (mL)
P1	0,300	50,00
P2	0,500	50,00
P3	0,500	25,00
P4	0,750	25,00
P5	1,000	25,00
P6	1,000	20,00
P7	0,600	10,00
SCQ	0,600	50,00

## iii) Solução de controlo de qualidade (SCQ)

A solução de controlo de qualidade foi preparada por mistura de 0,600 mL de cada solução padrão mãe de aminas biogénicas e aferido o volume final a 50,00 mL com TCA a 5%.

## iv) Solução de cloreto de dansilo (10 000 ppm)

A solução de derivatização foi preparada dissolvendo 100,0 mg de cloreto de dansilo em 10,00 mL de acetona.

## v) Solução de carbonato de sódio (solução saturada)

Esta solução foi preparada pesando 17,00 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para um balão de 50,00 mL e aferiu-se com água ultra-pura.

## vi) Solução de hidróxido de amónia a 25%

Para preparar esta solução adicionou-se 25,0 mL de hidróxido de amónia num balão de 100,0 mL e aferiu-se com água ultra-pura.

## vii) Solução de ácido tricloroacético a 5 %

Esta solução foi preparada dissolvendo 25,00 g de ácido concentrado em 500,0 mL de água ultra-pura.

## 2.5 TRATAMENTO DA AMOSTRA

### 2.5.1 PROCESSO DE EXTRAÇÃO

Geralmente, os métodos analíticos (HPLC e TLC) para a análise de aminas biogénicas, envolvem 3 passos: remoção das aminas biogénicas, purificação do extrato e derivatização. Neste estudo de aplicação da cromatografia de camada fina apenas se procedeu à extração e à derivatização.

Com base em procedimentos de extração pré-existentes (Dadáková *et al.*, 2009), procedeu-se a algumas alterações necessárias ao sucesso da extração tendo em conta o tipo de amostra em estudo. O processo de extração criado e seguido foi o seguinte: adiciona-se 1,5 g de amostra a 5 mL de TCA a 5% num tubo de Falcon, leva-se de seguida ao vortex (favorecendo, deste modo um melhor contacto da amostra com o TCA). A amostra é, de seguida, homogeneizada durante 15 minutos no ultrassons, procedendo-se à sua centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos. Após a solução sofrer centrifugação e apresentando uma boa separação dos seus componentes, procede-se à decantação e filtração (com papel de filtro corrente) do sobrenadante para um balão de aferição de 25 mL. Este procedimento é repetido mais uma vez usando a mesma amostra, ou seja, adiciona-se os 5 mL de TCA aos mesmos 1,5 g de amostra usada anteriormente. No fim, o balão volumétrico é aferido com TCA a 5%.

### 2.5.2 PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO

Para se proceder à derivatização de amostras e soluções padrão o procedimento usado foi: adiciona-se a um tubo de ensaio 1mL da solução a analisar juntamente com 0,2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturada e por fim 1 mL cloreto de dansilo. A mistura é agitada no vortex e colocada no escuro em banho de ultrassons durante 30 minutos a 40°C. De seguida, é adicionado à mistura 0,1 mL de hidróxido de amónia com o objetivo de precipitar o excesso de cloreto de dansilo, e é deixada a incubar novamente no escuro à temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, a mistura é centrifugada a 3400 rpm durante 10 minutos. Decorrida a centrifugação é extraído o sobrenadante adicionando 2 mL de éter dietílico (3X) (usando o vortex durante 30 segundos após cada adição), para um goblé, o qual é colocado na *hotte* para favorecer a evaporação do solvente (procedimento baseado nos trabalhos de Shruti *et al.*, 2010 e Shalaby, 1999).

O extrato seco é dissolvido em 1,00 mL de acetato de etilo recorrendo, sempre que necessário ao ultrasons. Com o uso de uma pipeta de Pasteur de vidro, o extrato é colocado num *vial* devidamente etiquetado.

## 2.6 PROCESSO CROMATOGRÁFICO

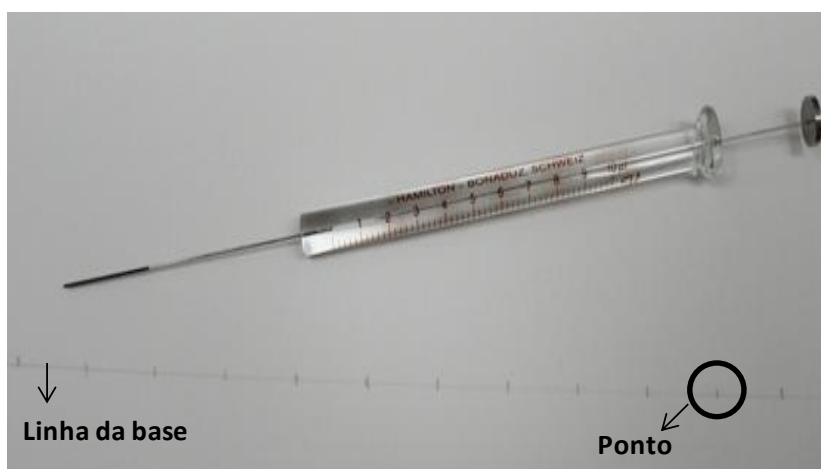
### 2.6.1 PREPARAÇÃO DAS PLACAS

Para a realização do TLC foram usadas placas comerciais de alumínio cobertas com sílica gel com aditivo fluorescente (Sílica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, 20 x 20cm). Estas devem ser lavadas com metanol (faz-se uma “corrida” usando metanol como eluente) e, posteriormente, colocadas numa estufa a uma temperatura de cerca de 105°C com o objetivo de serem ativadas. As placas devem permanecer guardadas num exsiccador até à sua utilização.

### 2.6.2 APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS E DAS SOLUÇÕES PADRÃO

Antes de aplicar a amostra e as soluções padrão na placa de TLC é necessário traçar uma linha de base (de modo “leve” a 2,0 cm da extremidade da placa), marcando-se sobre a mesma, a lápis, alguns pontos equidistantes. Estes pontos correspondem às posições onde se fará a posterior aplicação das amostras e as soluções padrão como se pode ver na figura 5.

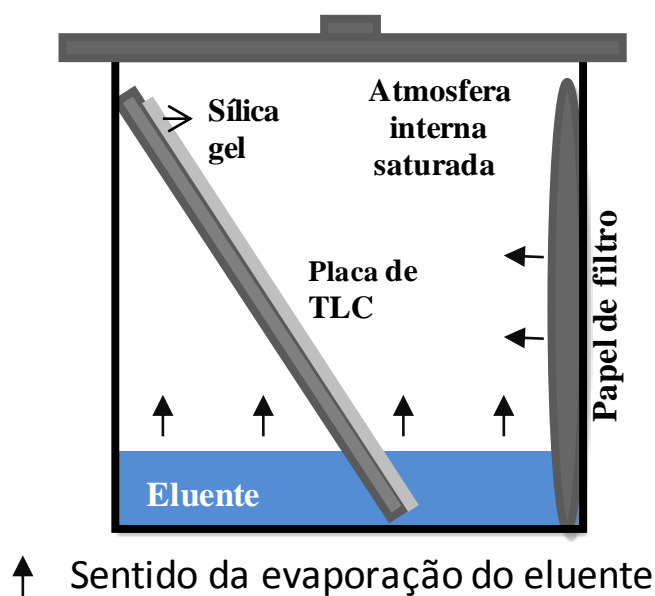
Após as amostras e padrões sofrerem o processo de derivatização, é aplicado 1  $\mu$ L de solução em cada ponto marcado na linha de base com uma microseringa (figura 5), tendo o cuidado de obter circunferências de pequeno diâmetro.



**Figura 5-** Microseringa e placa de TLC, com pontos marcados a lápis para aplicação das diferentes soluções

### 2.6.3 DESENVOLVIMENTO DAS PLACAS

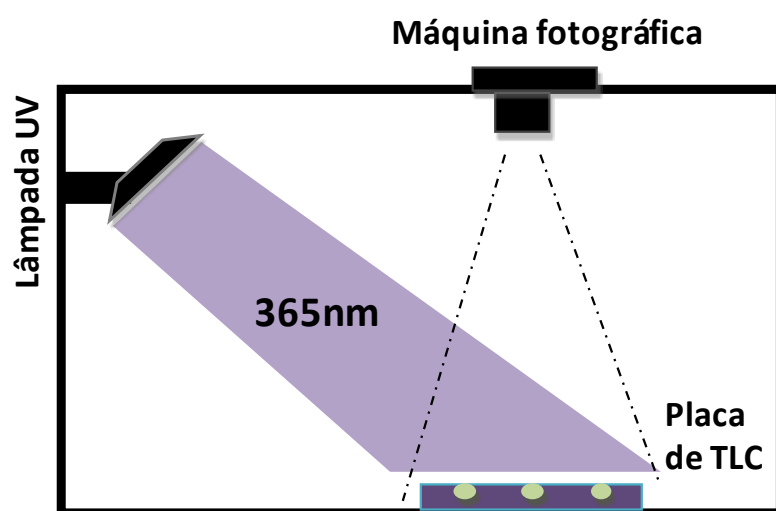
Após a aplicação das amostras e padrões na placa de TLC, esta é colocada cuidadosamente no interior de uma câmara cromatográfica, onde previamente foi colocado o solvente com uma altura de cerca 1 cm. A câmara cromatográfica tem de estar numa superfície horizontal, plana e em repouso para evitar ondulações na frente do solvente durante a corrida cromatográfica, deve estar devidamente isolada recorrendo-se para isso à aplicação de vaselina nas bordas da tampa. Para garantir a homogeneidade da atmosfera interna da câmara cromatográfica coloca-se papel de filtro embebido e imerso no eluente numa das paredes da câmara de forma a estar de frente para o lado da placa de TLC com a fase estacionária sílica gel. Na figura 6 está a representação da câmara no decorrer do desenvolvimento cromatográfico na placa de TLC. Deixa-se o desenvolvimento prosseguir até que a frente do solvente se tenha deslocado até a distância desejada (aproximadamente 1 a 2 cm de distância do topo), sendo então retirada a placa da câmara e marcando-se imediatamente a posição da frente do solvente com um lápis. (Vogel., 1986).



**Figura 6-** Representação da câmara cromatográfica no decorrer do desenvolvimento da placa de TLC

De seguida, as placas de TLC são secas numa estufa a uma temperatura de 40°C. Após a secagem as placas são visualizadas com uma lâmpada UV (365 nm) dentro de uma caixa escura, de modo a eliminar a influência da radiação do exterior e permitir tirar uma fotografia da placa cromatográfica, como se pode ver na figura 7, onde se

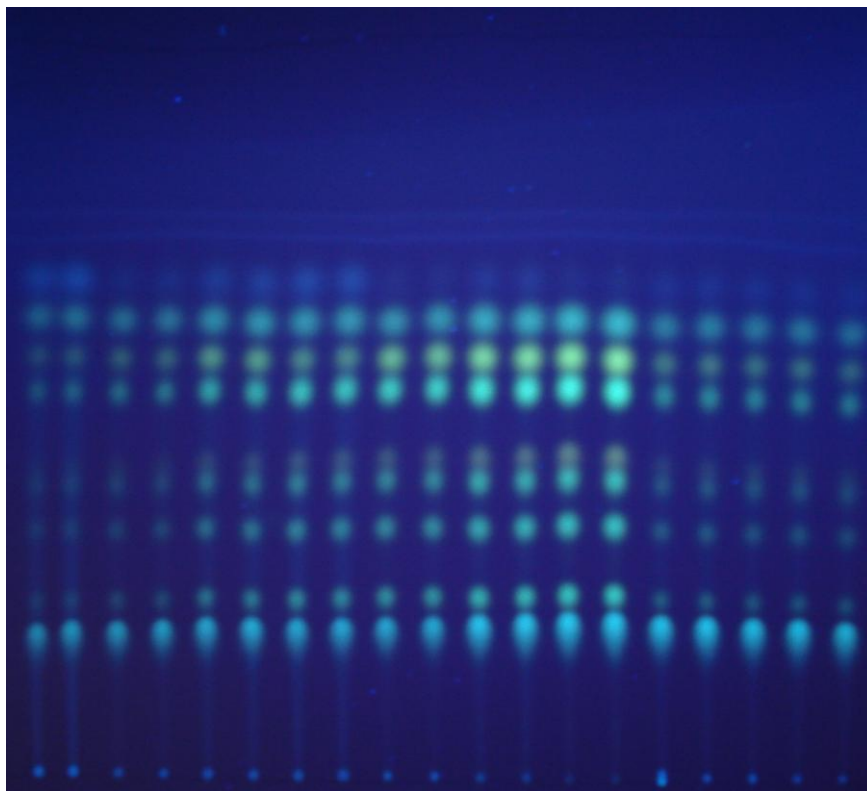
representa o sistema usado no laboratório para a aquisição da imagem fotográfica da placa de TLC.



**Figura 7-** Sistema utilizado para visualizar e fotografar as placas de TLC

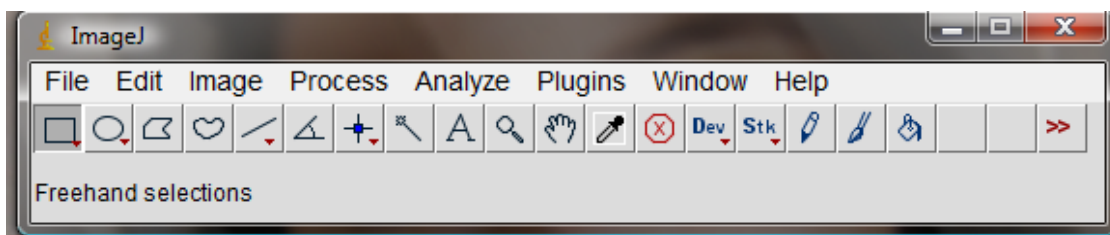
## 2.7 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA

A análise quantitativa de aminas biogénicas faz-se por tratamento da imagem obtida a partir da fotografia da placa de TLC submetida à luz ultravioleta de 365nm. (Figura 8).



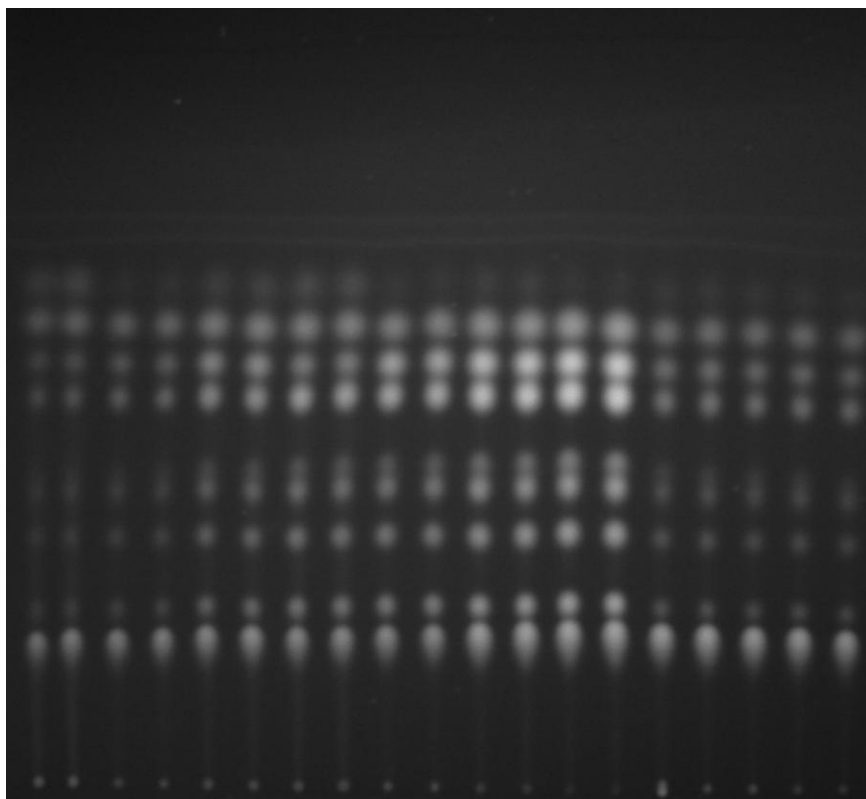
**Figura 8-** Fotografia de uma placa de TLC obtida sob a luz UV a 365nm

Este tratamento de imagem é feito através do programa *Image J* (figura 9), o qual permite fazer a conversão da fotografia inicial obtida a cores para a escala cinza (escala preferencialmente usada neste tipo de estudo) e obter também o densitograma (gráfico em linha onde estão representados os valores da densidade ótica medidos numa secção definida da imagem). Em anexo a este trabalho, encontra-se uma descrição deste procedimento.



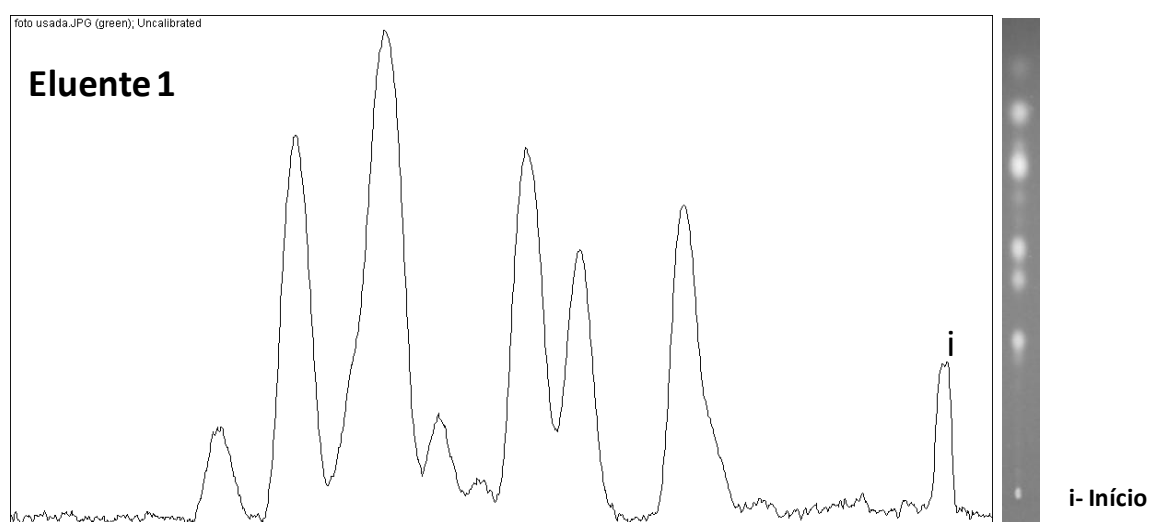
**Figura 9-** Barra de ferramentas do programa Image J

Na figura 10 mostra-se um exemplo típico do tratamento da imagem realizado com o *Image J*, na escala dos cinzentos, a partir da fotografia de uma placa de TLC a 365nm.



**Figura 10-** Imagem obtida na escala dos cinzentos após tratamento no Image J

Na figura 11 mostra-se um exemplo de um gráfico densitograma para uma secção seleccionada na placa de TLC, onde a letra “i” assinala o ponto onde se colocou a solução a analisar (linha de base).



**Figura 11-** Densitograma obtido para uma secção seleccionada na placa de TLC

# Capítulo 3

## APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

---

Neste capítulo são apresentados e discutidos todos os resultados obtidos neste trabalho. É apresentado o estudo da seleção do eluente para obter a melhor separação entre as aminas biogénicas analisadas, bem como a sua identificação através das manchas nas placas de TLC.

Da análise quantitativa apresentam-se os resultados das calibrações efetuados por TLC para cada amina biogénica, os respetivos limites de deteção e quantificação, o estudo da precisão e exatidão com as SCQ, a ainda o estudo da presença e quantificação de aminas biogénicas nos cogumelos estudados, em fresco.

### 3.1 SELEÇÃO DO ELUENTE E IDENTIFICAÇÃO DAS AMINAS BIOGÉNICAS

Nesta fase do trabalho selecionaram-se três eluentes com o objetivo de verificar qual a mistura que permite melhorar a resolução cromatográfica entre as aminas biogénicas. Na tabela 11 apresentam-se os 3 eluentes testados para a separação unidimensional usando soluções padrão individuais de 5 AB (cadaverina, espermina, espermidina, histamina, tiamina), as disponíveis nesta primeira fase do estudo. No terceiro eluente testou-se uma proporção de mistura dos solventes diferente da definida no trabalho de referência e substituiu-se a substância cancerígena, o benzeno, por tolueno que apresenta propriedades semelhantes.

**Tabela 11-** Eluentes testados no estudo

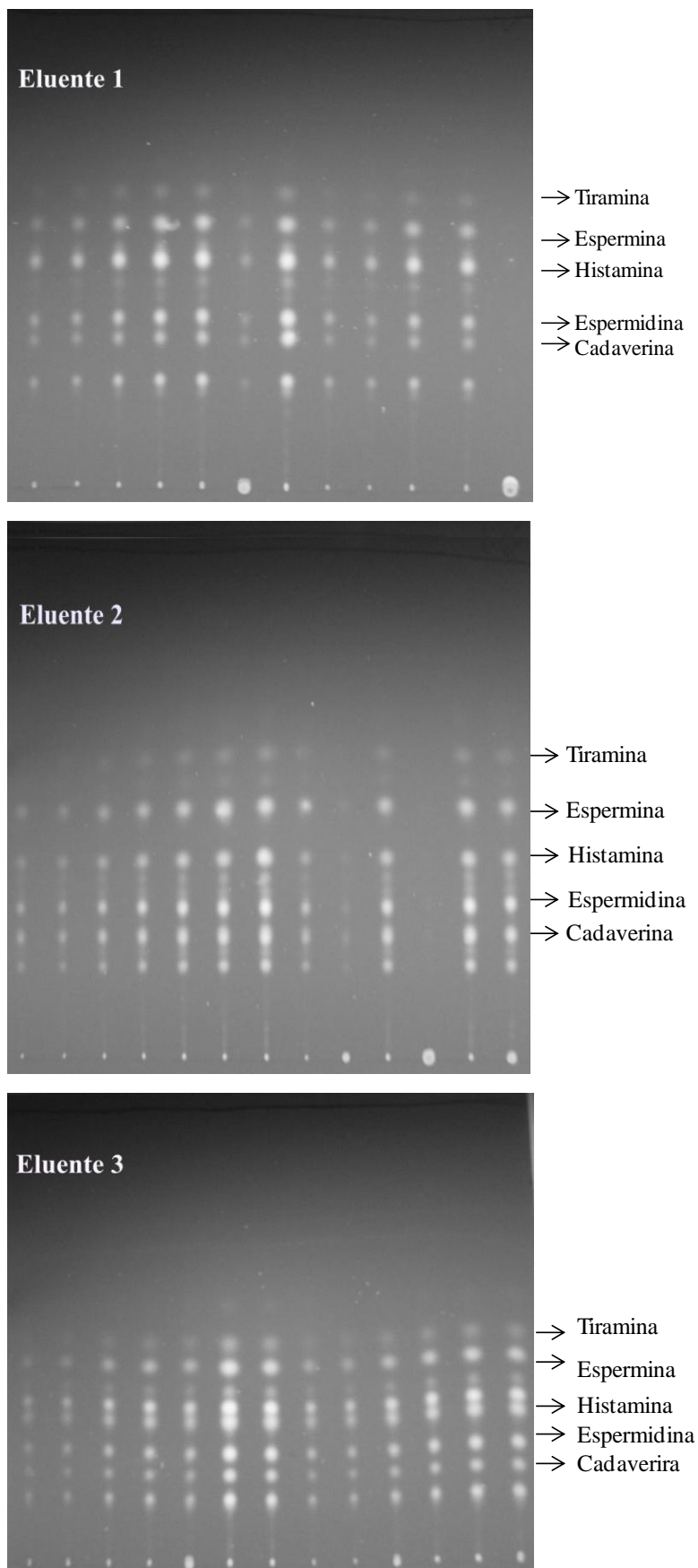
Eluentes	Proporção (mL)	Referências
1 - Clorofórmio: éter dietílico : trietilamina	40:10:10	Lapa-Guimarães e Pickova, 2004;
2 - Clorofórmio: éter dietílico : trietilamina	30: 20: 5	Latorre-Moratalla <i>et al</i> , 2009
3 - Clorofórmio: tolueno : trietilamina	30: 15: 5	Shalaby, 1999

Na figura 12 mostram-se as imagens, na escala de cinzento, das separações de 5 aminas biogénicas colocadas na placa de TLC para os 3 eluentes testados. Visualmente verifica-se que a separação é aceitável em cada eluente, mas para selecionar o melhor resultado foram tidas em conta várias condições:

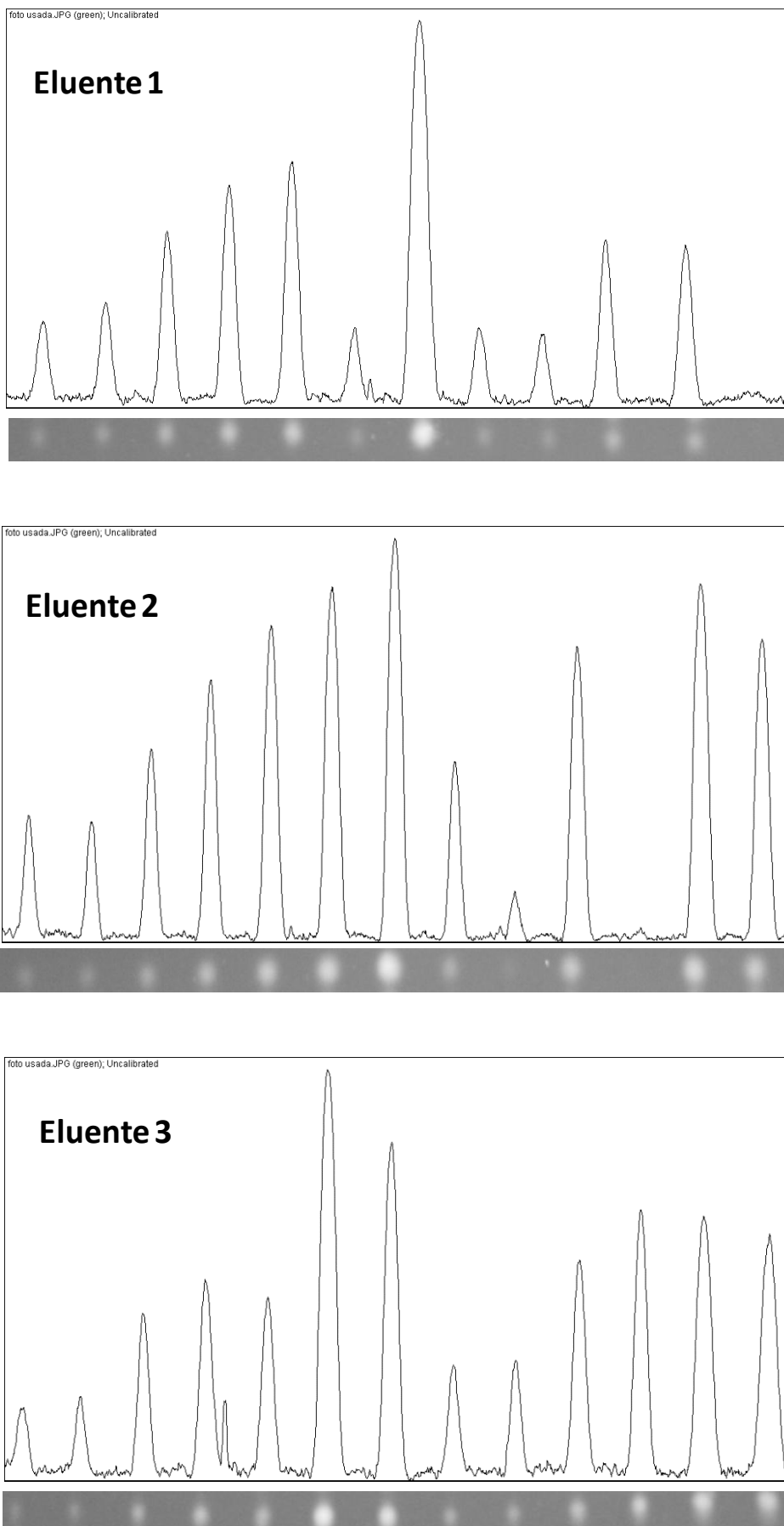
- ✓ Se a aplicação de soluções padrão de mistura das 5 aminas biogénicas em 13 pontos na placa de TLC permitia uma boa separação. Na figura 13 mostra-se,

como exemplo do obtido, o densitograma para o composto cadaverina para cada eluente testado.

- ✓ Se para cada solução padrão mistura analisadas na placa de TLC as amins biogénicas estão bem separadas entre si. Na figura 14 apresenta-se o densitograma de uma solução padrão mistura de 5 amins biogénicas obtido para cada eluente testado.



**Figura 12-** Fotografia, na escala de cinzentos, da separação de 5 AB por TLC com os 3 eluentes testados



**Figura 13-** Densitograma para o padrão cadaverina para os 3 eluentes testados

Os densitogramas apresentados na figura 13 foram obtidos selecionando uma secção horizontal na placa de TLC, estes mostram 13 picos referentes às manchas do padrão cadaverina presente na solução padrão de mistura que foi aplicada em 13 pontos em sequência (distância dos 2 cm) na placa de TLC.

Analisando os densitogramas apresentados na figura 13 é visível a ausência de 2 das adições do padrão mistura no eluente 1 – o que, possivelmente, dever-se-á a um erro na colocação da solução na placa de TLC - razão pela qual apenas se verificam 11 picos. O mesmo se constata no eluente 2, em que uma adição não subiu, apresentando este 12 picos.

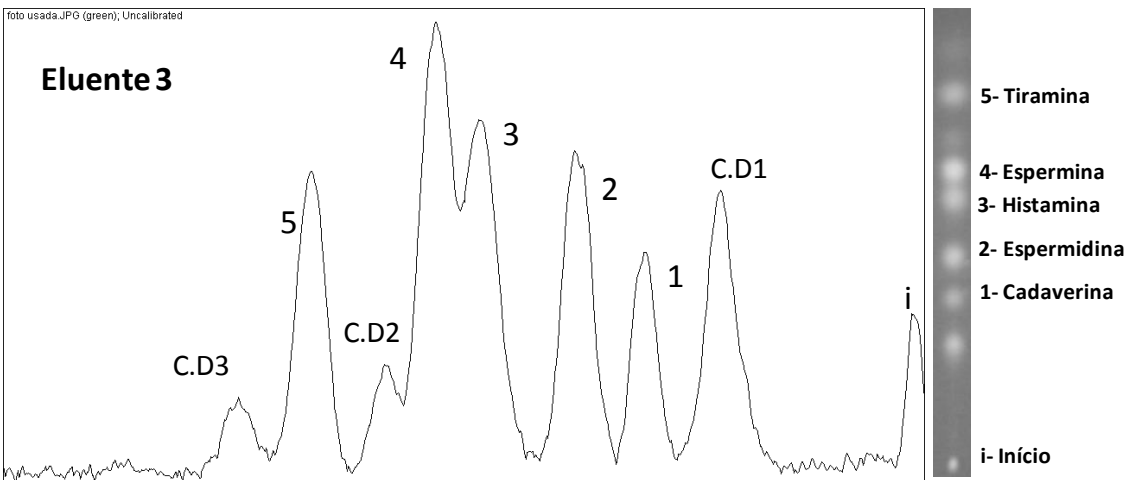
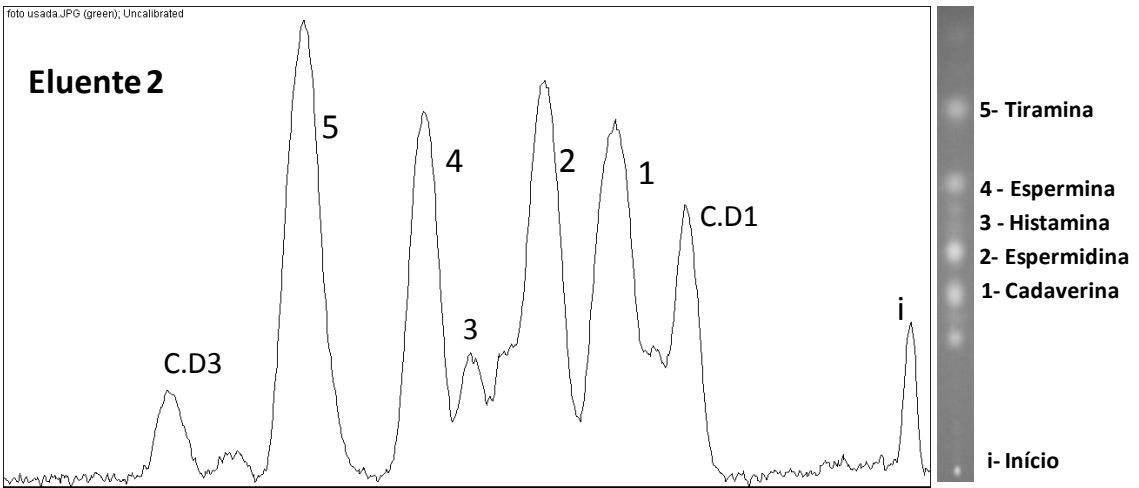
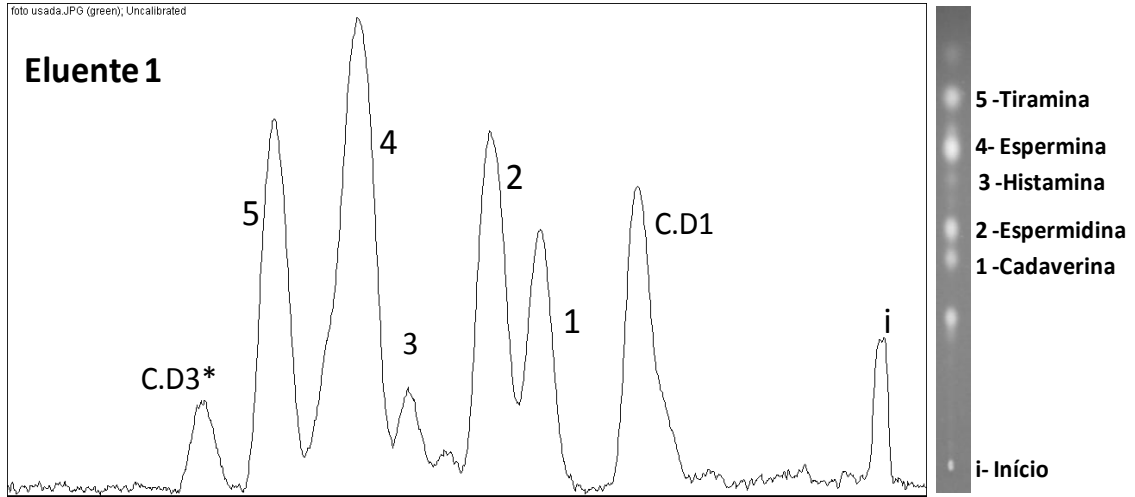
Globalmente os densitogramas mostram, para o padrão cadaverina, de 13 picos com uma boa separação. Atendendo a esta boa separação entre os picos foi testado um maior número de pontos de adição na placa de TLC, tendo-se otimizado a aplicação para 19 pontos como se pode ver mais à frente neste estudo.

Todavia, em termos de eficácia de separação, os 3 eluentes parecem ser muito semelhantes.

Os densitogramas apresentados na figura 14 foram obtidos selecionando uma secção vertical na placa de TLC referentes à separação de uma das soluções padrão mistura com os 5 padrões em estudo. Através destes, é possível constatar que dos 3 eluentes testados, o que apresenta menos sobreposição dos picos é o eluente 1.

No caso do eluente 2 é visível uma grande sobreposição dos picos das aminas biogénicas cadaverina, espermidina e histamina. No eluente 3, observa-se uma elevada sobreposição entre os picos das aminas biogénicas histamina e espermina. O primeiro pico (assinalado com “i”) corresponde à colocação da solução padrão mistura na linha de base do TLC.

É de notar que o segundo pico, assinalado com “CD 1” (composto desconhecido) é uma contaminação que aparece ao longo de todo o trabalho experimental, que tem origem na composição dos próprios padrões comerciais de aminas biogénicas usados.



CD\* - Composto Desconhecido

Figura 14- Densitograma para os 5 padrões para os 3 eluentes testados

Na Tabela 12 mostram-se os fatores de retenção das 5 aminas biogénicas calculados para cada eluente testado, com o propósito de verificar o quão diferentes são os picos obtidos para os 3 eluentes.

**Tabela 12-** Fatores de retenção dos 3 eluentes testados

	Fator de retenção (Fr)		
	Eluente 1	Eluente 2	Eluente 3
<b>CD 1</b>	0,22	0,18	0,14
<b>Cadaverina</b>	0,34	0,26	0,19
<b>Espermidina</b>	0,38	0,31	0,24
<b>Histamina</b>	0,45	0,38	0,31
<b>Espermina</b>	0,51	0,41	0,34
<b>CD 2</b>	--	--	0,41
<b>Tiramina</b>	0,56	0,48	0,43
<b>CD 3</b>	0,61	0,62	0,49

CD- composto desconhecido

Comparando os fatores de retenção dos eluentes testados, podemos afirmar que estes mostram que o eluente 1 é o preferencial, pois é o que apresenta valores mais distanciados entre os compostos quando comparados com os restantes eluentes, o que faz com que haja uma separação mais definida das aminas biogénicas na placa.

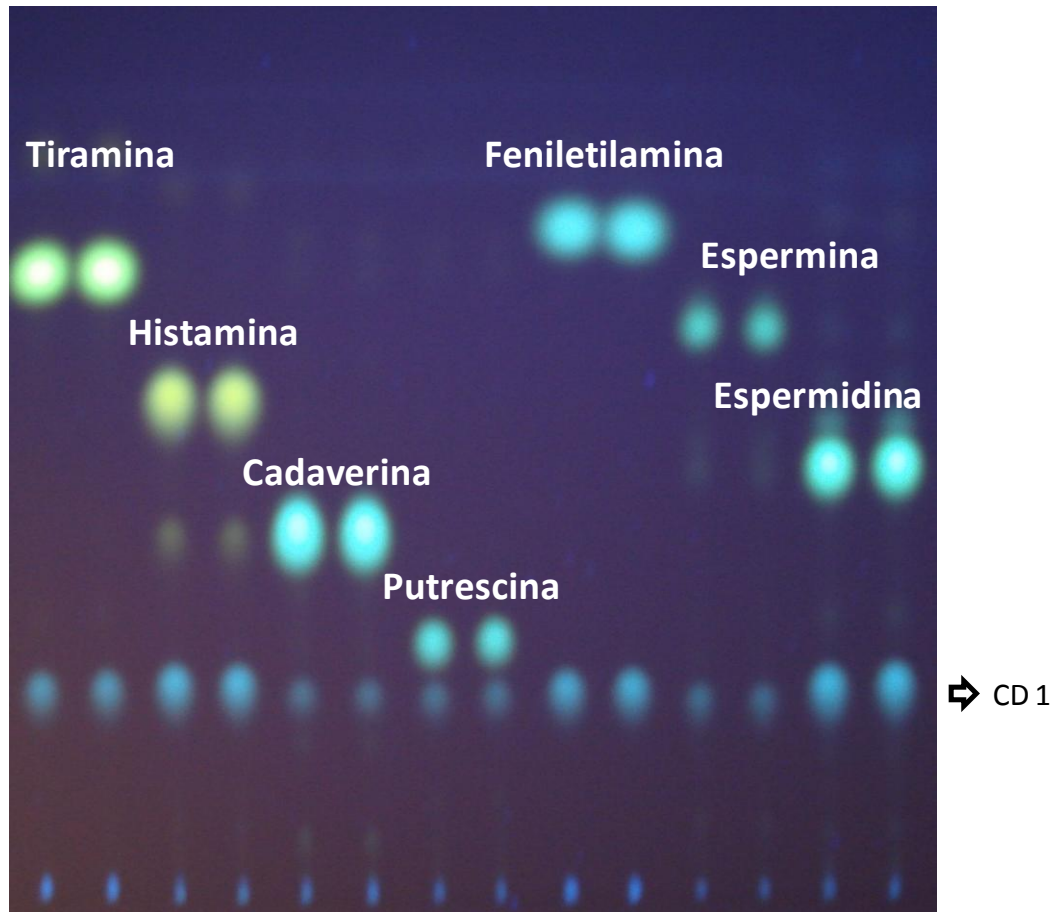
### 3.1.1 SEPARAÇÃO DAS 7 AMINAS BIOGÉNICAS POR TLC

Com a posterior aquisição de mais 2 aminas biogénicas padrão (putrescina e 2-feniletilamina), procedeu-se à obtenção de placas de TLC com a aplicação das 7 aminas biogénicas padrão na mesma placa, e à determinação dos respetivos Fr individuais, usando o eluente selecionado. A figura 15 exibe uma placa de TLC obtida nestas condições, localizando-se nela as 7 aminas biogénicas usadas neste estudo.

Analisando a figura 15 pode afirmar-se que é visível a presença de uma contaminação (CD 1 com  $Fr = 0,22$ ) em todos os padrões individuais. No caso da histamina é visível uma contaminação de uma outra amina biogénica, a cadaverina, com  $Fr = 0,34$ . O mesmo se passa no caso da espermina sendo visível uma contaminação pela amina biogénica espermidina ( $Fr=0,38$ ) e, por sua vez, esta também aparece contaminada pela putrescina ( $Fr=0,24$ ). Estas contaminações podem dever-se: a um armazenamento dos padrões de forma inapropriada, ou as respetivas embalagens estarem abertas há muito

tempo sendo alvo de deterioração, ou ainda, ao seu grau de pureza não corresponder ao que consta no respetivo rótulo.

Na tabela 13 mostram-se os valores de Fr obtidos para as 7 aminas biogénicas.



**Figura 15-** Identificação dos 7 padrões em estudo numa placa de TLC. Cada solução padrão individual está colocada em duplicado, em dois pontos sucessivos.

**Tabela 13 -** Valores do fator de retenção médios das 7 aminas biogénicas usando o eluente escolhido

Composto	Fator de retenção
Putrescina	0,24
Cadaverina	0,34
Espermidina	0,38
Histamina	0,45
Espermina	0,51
Tiramina	0,56
2-Feniletilamina	0,63

Analisando a tabela 13 pode verificar-se que a amina biogénica que apresenta o fator de retenção mais baixo é a putrescina, seguida da cadaverina, espermidina,

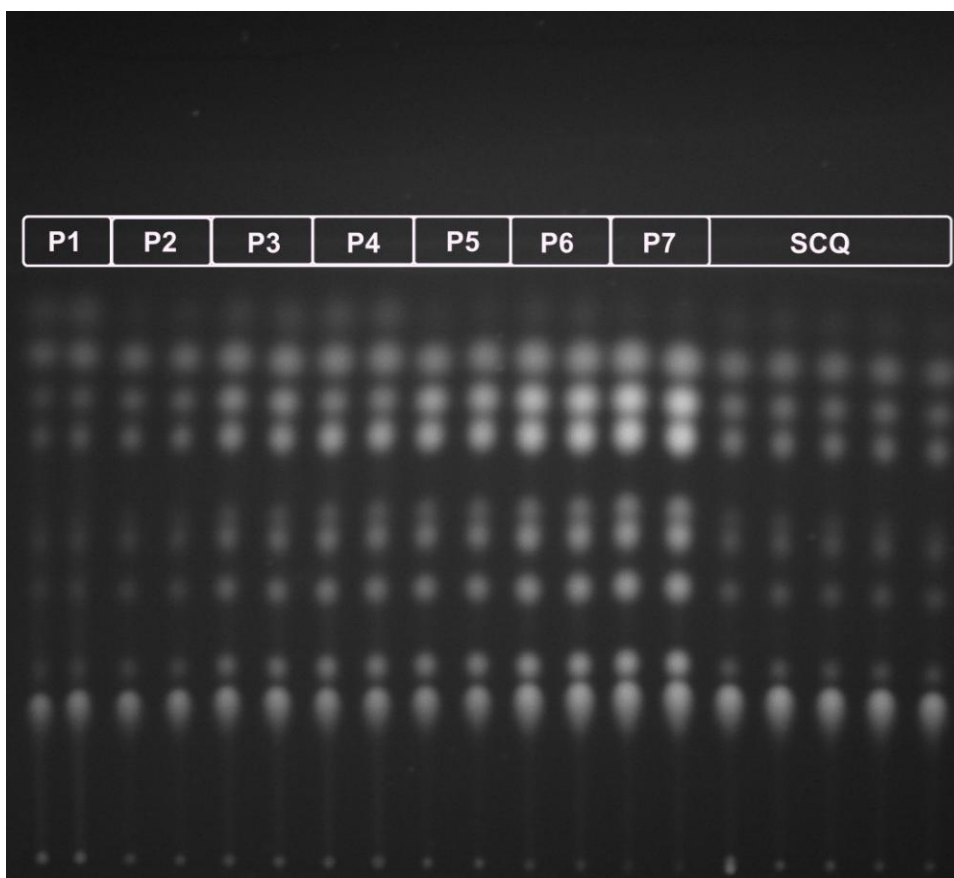
histamina, espermina, tiramina, 2-feniletilamina. Constata-se também que os valores dos fatores de retenção anteriormente calculados para as 5 aminas biogénicas se mantêm semelhantes. Em relação aos fatores de retenção dos dois novos padrões conclui-se que estes são muito distantes em relação aos já existentes, deste modo não se verifica a sobreposição com os mesmos.

### **3.2 ANÁLISE QUANTITATIVA**

Com a identificação da posição de cada amina biogénica individual na placa de TLC usando o eluente 1 e com os respetivos fatores de retenção definidos, prepararam-se várias soluções padrão de mistura com diferentes concentrações com o objetivo de se proceder à análise quantitativa.

Na figura 16 mostra-se uma fotografia de uma placa cromatográfica obtida no estudo da calibração, efetuando a análise simultânea das 7 aminas biogénicas (ver no capítulo 2 o modo de preparação). Na placa de TLC foi aplicado 1  $\mu$ L de cada solução padrão de mistura de calibração (P1 a P7), em duplicado, e 1  $\mu$ L de solução de controlo de qualidade (repetida 5 vezes).

### 3.2.1 MISTURA DE PADRÕES



**Figura 16-** Fotografia, escala de cinzento, das soluções padrão de mistura usadas

As concentrações da solução mãe das respectivas 7 soluções padrão de mistura em estudo são apresentadas na tabela 14.

**Tabela 14-** Concentração de cada amina biogénica (mg/L) na solução mãe, nas soluções padrão de mistura de calibração (P1 a P7) e na SCQ.

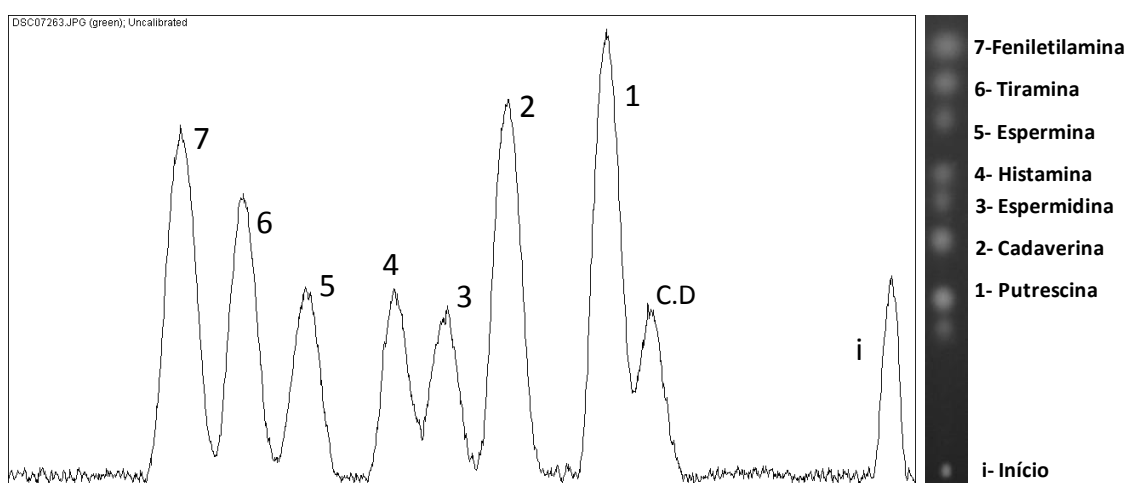
COMPOSTO	Solução mãe	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	SCQ
Putrescina	1003,00	6,02	10,03	20,06	30,09	40,12	50,15	60,18	12,04
Cadaverina	991,09	5,95	9,91	19,82	29,73	39,64	49,55	59,47	11,89
Espermidina	984,31	5,91	9,84	19,69	29,53	39,37	49,22	59,06	11,81
Histamina	974,76	5,85	9,75	19,50	29,24	38,99	48,74	58,49	11,70
Espermina	961,54	5,77	9,62	19,23	28,85	38,46	48,08	57,69	11,54
Tiramina	959,05	5,75	9,59	19,18	28,77	38,36	47,95	57,54	11,51
2- Feniletilamina	875,47	5,25	8,75	17,51	26,26	35,02	43,77	52,53	10,51

Como se pode concluir analisando a tabela 14, as concentrações da solução mãe para as 7 aminas biogénicas em estudo são muito próximas, exceto no caso da 2-

feniletilamina, pelo facto de esta apresentar uma mancha de grande diâmetro quando usada na mesma concentração que as restantes. Por este motivo teve-se que diminuir a sua concentração.

A concentração das amins biogénicas vai aumentando ao longo das adições feitas na placa de TLC ou seja, de P1 a P7 há uma crescente intensidade de “cor cinzento claro” da mancha num fundo preto, o que significa um aumento de concentração do composto.

Na figura 17 está o exemplo de um densitograma obtido para a análise do padrão P3, no qual são obtidas as áreas pretendidas para as 7 amins biogénicas.



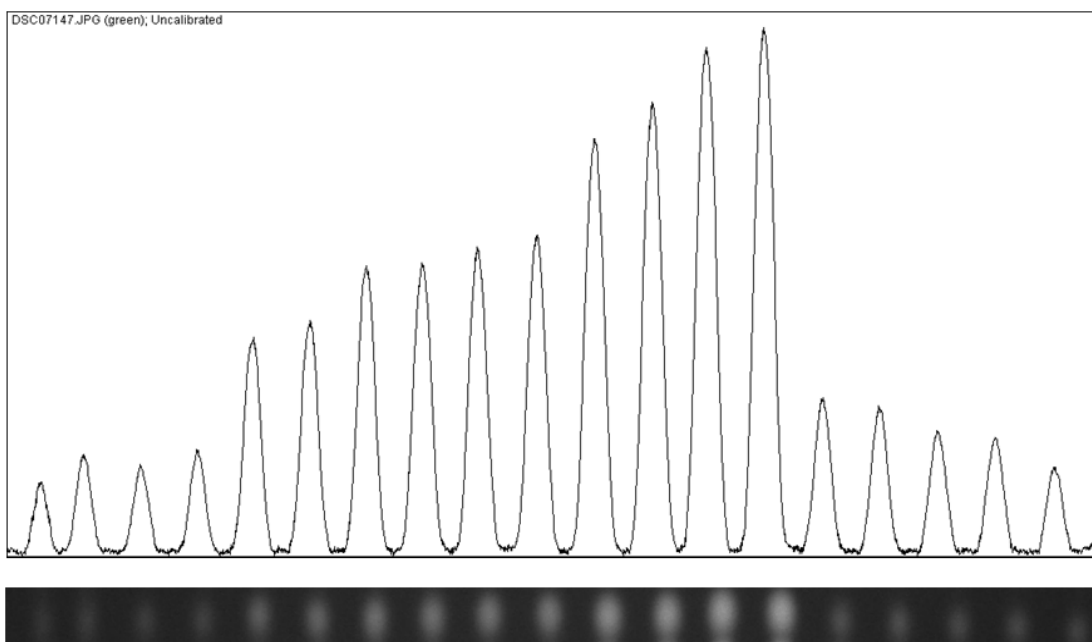
**Figura 17-** Densitograma típico da separação das 7 amins biogénicas usando o *Image J* (solução padrão P3)

Na figura 18 apresenta-se um exemplo de um densitograma referente à adição de 19 pontos. Este é obtido através da análise da intensidade nas manchas pertencentes a uma secção horizontal seleccionada na placa de TLC como se pode ver na barra correspondente à putrescina.

Analisando o densitograma da figura 18 constata-se de forma clara a separação de 19 manchas traduzidas pelo picos a associados aos 19 pontos de colocação de soluções para analisar por TLC. Com este resultado pode afirmar-se que mesmo usando um maior número de pontos na placa de TLC em relação ao número anteriormente usado neste trabalho (13), estes continuam a ter uma excelente resolução (separação entre picos).

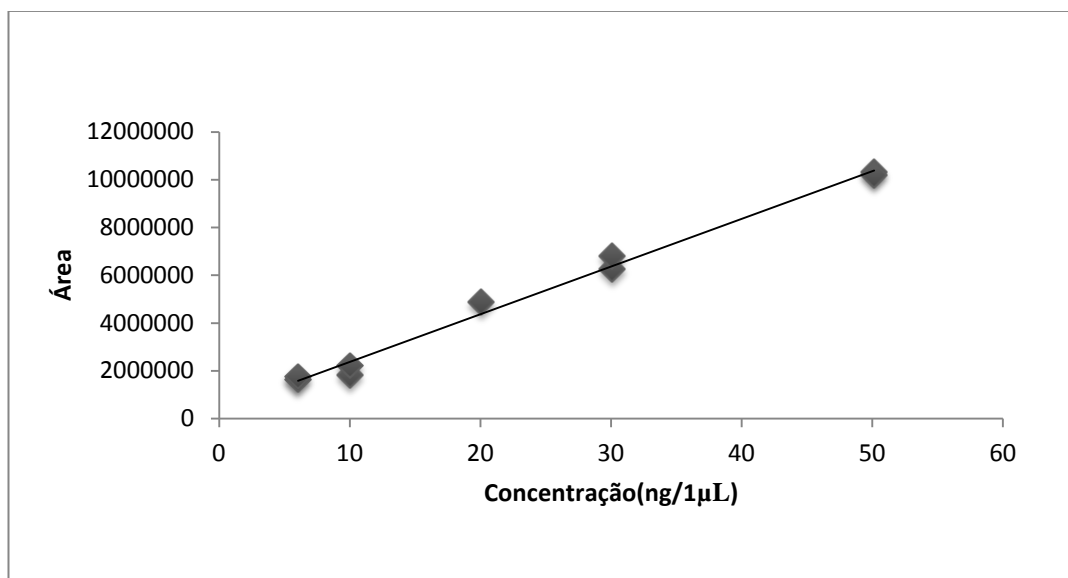
A partir do densitograma obteve-se a área de cada pico que, relacionando com a concentração do composto na solução padrão, permitiu fazer a calibração. Na figura 19

é dado um exemplo da calibração obtida para a amina biogénica putrescina. O gráfico mostra que há uma relação linear direta entre as áreas obtidas dos picos dos densitogramas e as respetivas concentrações de cada composto nas soluções padrão de mistura de calibração associada ao respetivo pico. O coeficiente de correlação,  $R= 0,995$  mostra que o modelo linear é obtido com pontos muito próximos da reta ajustada.



**Figura 18-** Densitograma obtido para a secção seleccionada na placa de TLC referente ao composto putrescina

No tratamento dos dados foram estabelecidas relações lineares entre as áreas dos picos do densitograma e as massas do conjunto em questão. Em geral, verificou-se que os resultados do padrão 7 não seguiam a tendência linear dos restantes padrões - por possível saturação do sinal - pelo que, não foram considerados na regressão linear.



**Figura 19-** Reta de calibração obtida para a putrescina

Os parâmetros da regressão linear obtidos para a calibração de cada amina biogénica (intervalo dinâmico, declive, ordenada na origem e coeficiente de correlação) são apresentados na tabela 15. Nos intervalos dinâmicos considerados neste estudo verificou-se serem os corretos pois foi possível obter relações lineares entre os sinais e todas as concentrações das soluções padrão de calibração.

Em geral, os declives são próximos entre si para as aminas biogénicas (aproximadamente igual a  $2 \times 10^5$ ), exceto no composto 2- feniletilamina, com uma elevada sensibilidade, na ordem dos  $4,5 \times 10^5$ , relativamente aos outros.

De um modo geral, os coeficientes de correlação (R) obtidos para a maioria das aminas biogénicas foi superior a 0,99, exceto na calibração da 2-fenileilamina cujo R = 0,977.

**Tabela 15-** Retas de calibração de cada AB ensaiada

Composto	Gama de concentração (ng/1µL)	Declive	Ordenada na origem	Coefficiente de correlação, R
Putrescina	6,02-50,15	184162,00	473236,90	0,995
Cadaverina	5,96-49,55	201054,80	439357,10	0,993
Espermidina	5,91-49,22	185849,10	387814,70	0,997
Histamina	5,85-48,74	194362,40	728655,90	0,996
Espermina	5,77-48,08	224190,70	475076,20	0,996
Tiramina	5,75-47,95	270825,60	425290,00	0,998
2-Feniletilamina	5,25-43,77	453306,50	266262,60	0,977

No estudo da calibração pretendeu-se também verificar os limites de deteção e quantificação associados à análise das aminas biogénicas por TLC.

Os valores obtidos dos limites de deteção e quantificação para cada uma das aminas biogénicas através das calibrações efetuadas em placas de TLC encontram-se registados na tabela 16.

Os limites de deteção situaram-se entre 2,6 mg/L (tiramina) e 5,8mg/L (2-feniletilamina), enquanto que os limites de quantificação se situam entre 7,9 mg/L (tiramina) e 17,6 mg/L (2-feniletilamina).

**Tabela 16-** Limites de deteção e quantificação no estudo do desempenho do método estabelecido para análise de AB por TLC

Composto	Limite de deteção (mg/L)	Limite de quantificação (mg/L)
Putrescina	3,8	11,5
Cadaverina	4,2	12,6
Espermidina	3,4	10,4
Histamina	3,5	10,7
Espermina	3,5	10,5
Tiramina	2,6	7,9
2-Feniletilamina	5,8	17,6

Pode verificar-se que a amina biogénica que apresenta o maior valor do LD é 2-feniletilamina, seguindo-se a cadaverina, putrescina, espermina e histamina (igual valor), espermidina e tiramina.

Em relação ao LQ, a ordem é muito semelhante, a 2-feniletilamina é igualmente a que apresenta o valor mais elevado seguindo-se cadaverina, putrescina, histamina, espermina, espermidina e, por último a tiramina.

Na tabela 17 são mostrados os resultados do cálculo do erro relativo percentual (Er%) e do desvio padrão relativo percentual (Sr%) para uma SCQ analisada no mesmo dia por 3 vezes. Como os níveis de concentração de aminas biogénicas que se analisam por TLC são níveis vestigiais o critério de aceitação é o SR% e ER% serem inferiores a 20%.

Os resultados obtidos neste estudo são visivelmente maiores quando comparados com outros métodos alternativos, nomeadamente por HPLC, onde se obtêm resultados mais baixos para as aminas biogénicas usadas neste estudo. Num estudo feito usando

HPLC foram obtidos valores de LD inferiores a 0,17 mg/L e valores de LQ inferiores a 0,5mg/kg respetivamente (Sánchez e Capillas, 2012).

**Tabela 17** - Exatidão e precisão obtidos com uma SCQ no estudo do desempenho do método de estabelecido para análise de AB por TLC

Composto	C. esperada (mg/L)	Er%	Sr%
Putrescina	12,0	4,6	3,0
Cadaverina	11,9	3,8	4,9
Espermidina	11,8	7,4	15,6
Histamina	11,7	10,2	11,9
Espermina	11,5	0,2	7,7
Tiramina	11,5	0,2	12,3
2-Feniletilamina	10,5	17,0	9,5

Através dos dados apresentados na tabela 17 pudemos afirmar que a percentagem de erro obtida é aceitável, pois os valores de SR% e ER% são inferiores ou iguais a 17% e 16%, respetivamente. A amina biogénica espermidina apresenta o maior valor de SR% obtido (15,6%), no caso do erro relativo percentual o valor mais elevado foi obtido para a amina biogénica 2- feniletilamina (17%).

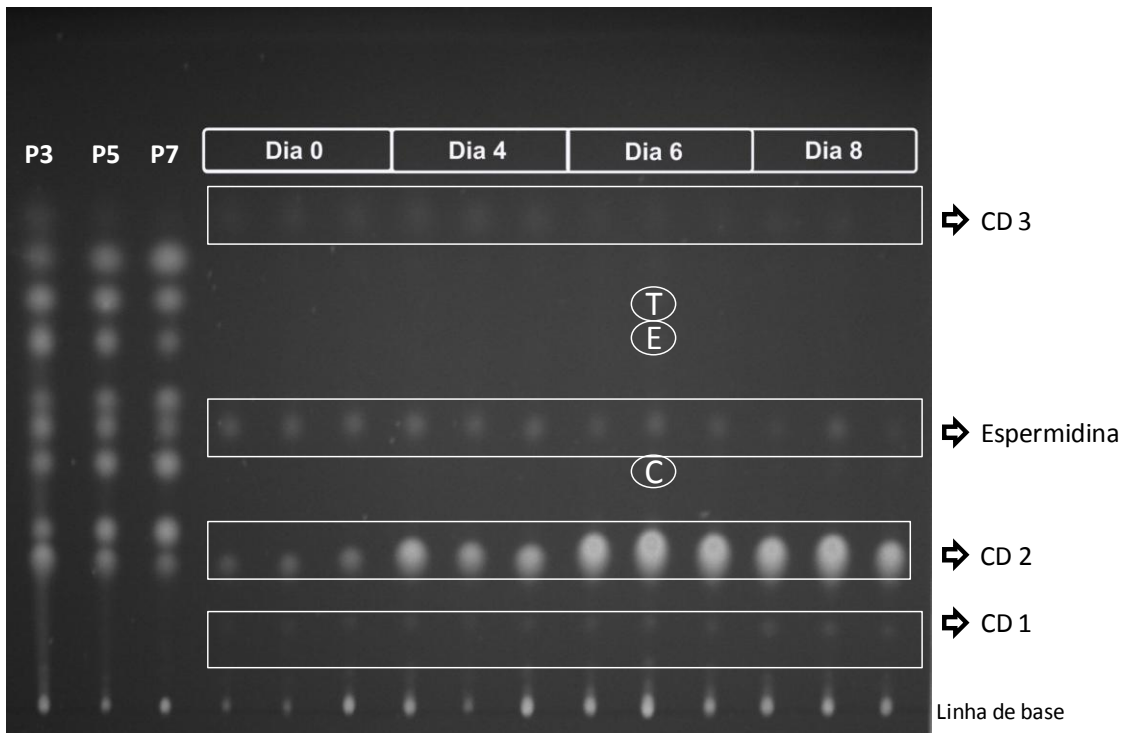
Globalmente, os resultados do estudo de validação do método estabelecido neste trabalho para análise de aminas biogénicas por TLC mostram que:

- o método é aceitável, pois os valores de Er% e SR% apresentam-se inferiores a 20%.
- a SCQ usada tem os níveis de concentração definidos pelo limite de quantificação, pelo que, se considera que otimizando o processo de aquisição de imagem da placa de TLC se conseguirá ainda melhores resultados.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM *PLEUROTUS OSTREATUS* EM FRESCO

Os ensaios com cogumelos *Pleurotus ostreatus* frescos foram estabelecidos de forma a seguir a sua deterioração no tempo. A primeira análise corresponde ao dia em que se adquiriu os cogumelos (após laminação), logo após à abertura da embalagem, e os restantes após 4, 6, 8 dias de exposição dos cogumelos à temperatura ambiente.

Com este estudo pretendeu-se verificar quais as aminas biogénicas existentes nesta espécie de cogumelos de cultivo e se é possível identificar uma ou várias aminas biogénicas ou outros compostos que permitam estabelecer, pelo seu nível de concentração, o grau de deterioração.



**Figura 20-** Placa representativa das aminas biogénicas encontradas em cogumelos *P.ostreatus* em fresco; **T**- tiramina, **E**- espermina, **C**-cadaverina

Na figura 20 é mostrada a fotografia da placa de TLC onde se aplicaram os extratos dos cogumelos derivatizados. Os três primeiros pontos aplicados (à esquerda) são de soluções padrão de calibração (P3, P5 e P7) e os restantes pontos correspondem a colocações dos extratos dos cogumelos obtidos para os dias 0, 4, 6 e 8 de exposição dos cogumelos ao ambiente, em triplicado. A placa de TLC mostra que os padrões P3, P5 e P7 têm o perfil de desenvolvimento esperado.

O desenvolvimento dos extratos na placa de TLC mostram a presença de 4 manchas, das quais se pode identificar a amina biogénica espermidina. Esta amina biogénica já tinha sido anteriormente identificada em cogumelos cultivados (Kalac *et al*, 2009). Das 3 manchas desconhecidas uma delas surgiu como predominante nos extratos (CD 2) deste cogumelo; o sinal de outra substância foi-se atenuando ao longo do tempo (CD 3). Outro resultado relevante foi o facto da espermidina se manter praticamente constante ao longo dos 8 dias de exposição. No sexto dia detetou-se a presença de outras 3 aminas biogénicas diferentes (T, E e C), que foram identificadas como sendo, possivelmente, a tiramina, a espermina e a cadaverina.

Em suma, neste trabalho preliminar verificou-se que há dois compostos desconhecidos (CD 1 e CD 2) que se suspeita serem aminas biogénicas que, após a sua identificação, poderão ser usadas como indicadores do estado higiénico desta espécie de cogumelo (principalmente, o CD 2).

A análise da placa de TLC revela a presença de impurezas nos compostos adquiridos comercialmente, cuja presença pode estar ligada ao facto de a percentagem que consta nos rótulos não corresponder á realidade ou á possibilidade de os padrões estarem alterados por deficientes condições de armazenamento (como referido anteriormente).

### 3.3.1 QUANTIFICAÇÃO DAS AMINAS BIOGÉNICAS EM COGUMELOS P. OSTREATUS

Só foi possível proceder à quantificação de um dos 4 compostos encontrados, identificado como sendo a espermidina.

Na tabela 18 são apresentadas as áreas dos picos dos compostos presentes no densitograma ao longo dos 8 dias de estudo e, os seus respetivos fatores de retenção.

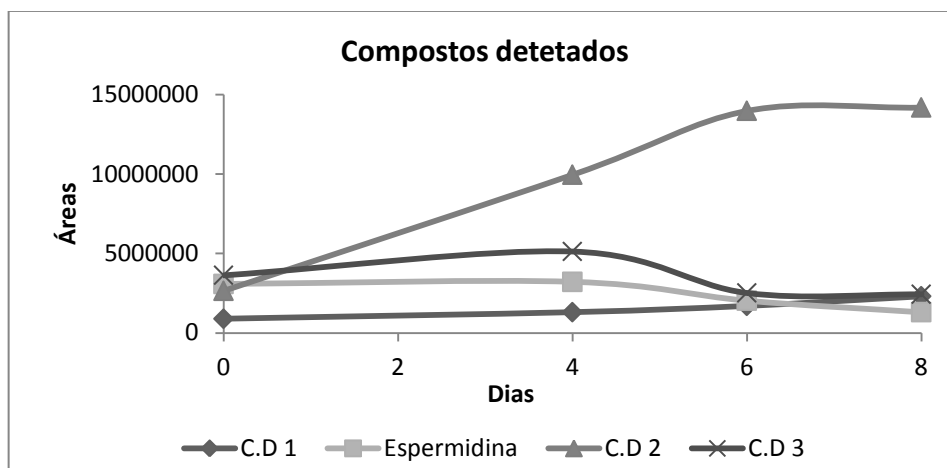
**Tabela 18-** Áreas dos compostos detetados e respetivos tempos de retenção

	DIAS				F. retenção
	0	4	6	8	
<b>CD 1</b>	890149	1304489	1701839	2306887	0,13
<b>CD 2</b>	2648227	9956534	13977437	14186632	0,20
<b>Putrescina</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	0,24*
<b>Cadaverina</b>	n.d	n.d	d	n.d	0,34*
<b>Espermidina</b>	3078796	3211901	2031365	n.d	0,41
<b>Histamina</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	0,45*
<b>Espermina</b>	n.d	n.d	d	n.d	0,51*
<b>Tiramina</b>	n.d	n.d	d	n.d	0,56*
<b>2- Feniletilamina</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	0,63*
<b>CD 3</b>	3630055	5126608	2520389	2436129	0,73

CD- Composto Desconhecido; n.d- não detetado; \* Fator de retenção esperado; d-detetado

Verificou-se que dos três compostos desconhecidos, um deles (CD 1) mostra uma tendência crescente dos níveis de concentração em relação ao tempo de exposição dos cogumelos ao ambiente como se pode ver na figura 21.

Podemos ver também através da figura 21 que o CD 3 mostra uma tendência decrescente em termos de intensidade; isto pode dever-se ao facto de se ir degradando ao longo do tempo.



**Figura 21-** Evolução das áreas relativas das possíveis AB presentes nos extratos de *P. ostreatus* ao longo dos 8 dias de conservação à temperatura ambiente.

Em relação á única amina biogénica que foi possível identificar, apresenta-se na tabela 19 os níveis de concentração obtidos usando a reta de calibração. Os resultados mostram que a concentração de espermidina vai decrescendo ao longo dos dias de exposição dos cogumelos ao ambiente: variou entre 0,034 e 0,072 mg/L de cogumelo fresco.

**Tabela 19-** Concentração apresentada pela espermidina ao longo dos 8 dias de estudo

	Concentração (mg/L)
Dia 0	0,072
Dia 4	0,076
Dia 6	0,054
Dia 8	0,034

A bibliografia existente sobre aminas biogénicas em cogumelos é reduzida, mostrando a real necessidade de se fazer mais estudos com este produto alimentar.

Os poucos estudos realizados mostram que, em geral, as aminas biogénicas encontradas em cogumelos foram tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, espermina, espermidina e cadaverina.

Dentro do género *Pleurotus*, nomeadamente o *Pleurotus eryngii* foram encontradas as aminas biogénicas espermidina, cadaverina, e agmatina (Nishimura *et al.*, 2006). A identificação, no presente estudo, da espermidina vem ao encontro dos resultados do único estudo encontrado sobre *Pleurotus ostreatus*, onde se identificaram as aminas biogénicas espermidina, putrescina e espermina (Kalač *et al.*, 2009).

Estudos com outros cogumelos mostram a presença de várias aminas biogénicas:

- em cogumelos frescos do género *Boletus badius* foram encontradas as aminas biogénicas, cadaverina e putrescina (Kalac̆ *et al.*, 1997),

- em cogumelos frescos dos géneros *Boletus chrysenteron* e *Boletus variegatus* foi verificada a presença da amina biogénica putrescina (Kalac̆ *et al.*, 1997),

- elevados níveis de feniletilamina foram encontradas em algumas espécies de cogumelos (Santos, 1996),

- em cogumelos comerciais de conserva foram encontradas as aminas biogénicas putrescina, tiramina, e 2-feniletilamina (Shalaby, 1996).

A amina biogénica histamina não foi referida em qualquer trabalho sobre cogumelos.

Neste trabalho, exceto a espermidina, as aminas biogénicas cadaverina, espermina e tiramina só após uma longa exposição dos cogumelos à temperatura ambiente (6º dia) é que foram detetadas.

# Capítulo 4

## CONCLUSÕES

---

Neste trabalho estabeleceu-se uma nova metodologia para a separação, identificação e quantificação de 7 aminas biogénicas em matrizes alimentares: tiramina, espermina, espermidina, putrescina, cadaverina, histamina e 2-feniletilamina.

Foi utilizada a técnica de TLC por ser uma técnica rápida, simples, versátil, económica, que não exige ser realizada por técnicos treinados e especializados e não requer grande volume de amostras (pequenas quantidades de amostra são suficientes para análise).

A revelação das placas era feita sob luz UV (365 nm) e a respetiva fotografia era sujeita a um programa de tratamento de imagem, o que permitiu uma adequada exploração dos resultados.

O eluente selecionado usado no trabalho foi uma mistura clorofórmio: éter dietílico: trietilamina (40:10:10), por ser, de entre as misturas testadas, a que permitiu uma melhor separação entre as aminas biogénicas padrão. Os níveis de concentração das aminas biogénicas ensaiados nas placas de TLC foram da ordem dos ng/1µL, por isso, esteve-se a trabalhar com níveis vestigiais, como aqueles que são expectáveis nos géneros alimentícios.

Estabeleceu-se uma nova metodologia de extração de aminas biogénicas para cogumelos e de derivatização destas a partir da conjugação de trabalhos já existentes. Na validação do método quantitativo das aminas biogénicas por TLC estudou-se o respetivo intervalo dinâmico a sensibilidade, o limite de deteção, o limite de quantificação, a precisão, e a exatidão, tendo-se constatado que o método analítico desenvolvido teve resultados de desempenho aceitáveis para a análise de aminas biogénicas.

No estudo da amostra de cogumelos de cultivo *Pleurotus ostreatus* frescos foram encontrados 4 compostos, dos quais 1 foi identificado de forma inequívoca como sendo uma amina biogénica, a espermidina. Em relação aos três restantes compostos desconhecidos, suspeita tratar-se de aminas biogénicas.

# Referências Bibliográficas

- AOAC. 1995c. Histamine in seafood: Fluorometric method. Sec. 35.1.32, Method 977.13. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed.; P.A. Cunniff, Eds. ; AOAC International, Gaithersburg, MD; pp. 6-17.
- Azevedo, G. (2010) “Contributos para a Avaliação de Diferentes Indicadores da Qualidade de Cogumelos Frescos *Pleurotus ostreatus*”. Dissertação de mestrado.
- Azevedo, N. (1982). Cogumelos (*Pleurotus Olearius*). Coleção Parques Naturais Nr. 5, Serviço Nacional de Parques e Reservas. Couverture Souple Glacee Ill, 15 x 22 Cm. Ill.
- Bonatti, M.; Karnopp, P.; Soares, H. M.; Furlan, S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chemistry*, [S.l.], v. 88, n. 3, p. 425-428, dec., 2004.
- Bononi, V., Capelari, M., Maziero, R., Trufem, S. (1999). Cultivo de Cogumelos Comestíveis. Coleção: Brasil Agrícola (2ª Edição).
- Breene WM (1990). Nutricional and medicinal value os specialty mushrooms. *Jornal od Food Protection*, 53(10): 883-894.
- Carneiro, S. (2001). Separação das frações de caseína de leite de vaca, ovelha e cabra por TLC e electroforese. Bragança: Escola Superior Agrária. Relatório do trabalho de fim de curso de engenharia biotecnológica.
- Dadáková E., Pelikánová T. e Kalac P. (2009). Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms. *Eur Food Res Technol* 230:163-171.
- Emer, J., Miller, J.H.M. (editores), (2005), “Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice”, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim, ISBN: 3-527-31255-2.
- Fernandes J. O. (2001). Desenvolvimento de metodologias de cromatografia gasosa – espectrometria de massa para a determinação de aminas biogénicas em vinhos do

Porto e em mostos. *Dissertação de doutoramento*. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Porto. 494 p.

Foschiera, José. (1999). “Modificação da superfície de sílica gel com grupos aromáticos para aplicação na pré-concentração de compostos fenólicos em meio aquoso.” Universidade federal do rio grande do sul. Instituto de química, dissertação.

Furlani, R e Godoy, H. (2007). Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27 (1): 154-157.

Garnweidner, E., Jankovics, G., Vasconcelos, M. (1999). Cogumelos: como identificar, classificar e apanhar cogumelos. Guia de cogumelos venenosos comestíveis. Rio de Mouro : Everest. ISBN 973-750-418-3.

Gonzalez-Fandos, E, Giménez M, Olarte C, Sanz S e Simon A. Effect of packaging conditions on the growth of micro-organisms and the quality characteristics of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*) stored at inadequate temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 89: 624 – 632.

Guzman, G. Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetideae): Diversity, Taxonomic Problems, and Cultural and Traditional Medicinal Uses. *Internacional Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 2, 29 p., 2000.

Halász, A.; Baráth, A.; Simonsarkadi, L.; *et al.* Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Science & Technology*, v. 5, n.2, p. 42-49, 1994.

Helm, C., Coradin, J., Kestring, D.(2009) Avaliação da Composição Química do Cogumelos Comestíveis *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus bisporus portobello*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*. ISSN 1517-5030 Colombo: Embrapa Florestas.

Innocente, N.; Biasutti, M.; Padovese, M.; Moret, S., 2007, “Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract”, *Food Chemistry*, 101, pp. 1285–1289.

Jaworska, G., Bernas, E. Qualitative changes in *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. mushrooms resulting from different methods of preliminary processing and

periods of frozen storage. 2009 Society of Chemical Industry J Sci Food Agric 2009; 89: 1066–107.

Kalač, P., Dadáková, E., Pelikánová, T. (2009). Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms. Eur. Food Res. Technol. 230, 2009: 163-17.

Kalac̆, P., & Kr̆íz̆ek, M. (1997). Formation of biogenic amines in four edible mushroom species stored under different conditions. Food Chemistry, 58, 233-236.

Lange, J., Wittmann, C. (2002). Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. Anal Bioanal Chem. 372(2):276-83.

Lapa-Guimarães J., Pickova J. (2004). New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A*. 1045: 223-232.

Latorre-Moratalla M.L., Bover-Cid S., Veciana-Nogués T., Vidal-Carou M.C. (2009). Thin-layer chromatography for the identification and semi-quantification of biogenic amines produced by bacteria. *Journal of Chromatography A*. 1216: 4128-4132.

Mandeel, Q. A.; Al-Laith, A. A.; Mohamed, S. A. Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [S.I.], v. 21, n. 4, p. 601-607, 2005.

Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M. C.; Izquierdo-Pulido, M.; Veciana-Nogués, M. T. (1995). Aminas biógenas en alimentos: unos microcomponentes de interés múltiple. *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 1 (4): 138-141.

Martinez, A. T.; Camarero, S.; Gutierrez, A.; Bocchini, P.; Galletti, G. C. Studies on wheat lignin degradation by *Pleurotus* species using analytical pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 58, 401-411, 2001.

Martins, F., Editor, J. (2004). Cogumelos. Património Natural Transmontano.

- Moda EM, Spoto MHF, Horii J, Zochi SS. Uso de peróxido de hidrogênio e ácido cítrico na conservação de cogumelos *Pleurotus sajor-caju* in natura. *Ciênc Tecnol Aliment Campinas*. 2005; 25(2): 291- 296.
- Nishimura, K., Shiina, R., Kashiwagi, K., Igarashi. (2006). Decrease in Polyamines With Aging and Their Ingestion from Food and Drink. *J. Biochem*. 139, 81-90.
- Önal A. (2007). A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry* **103**:1475-1486
- Paleólogos, E. K.; Chytiri, S. D.; Savvaidis, I. N.; Kontominas, M. G., 2003, “Determination of biogenic amines as their benzoyl derivatives after cloud point extraction with micellar liquid chromatographic separation”, *Journal of Chromatography A*, 1010, pp. 217-224.
- Rai, D. R. e Paul, S. (2007). Transient state in-pack respiration rates of mushroom under modified atmosphere packaging based on enzyme kinetics. *Biosystems Engineering*, 98: 319-326.
- 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.
- Rodrigo M, Calvo C, Sanchez T, Rodrigo C, Martinez A. Quantity of canned mushrooms acidified with glucono- $\delta$ - lactone. *Intern J Food Sci and Tech*. 1999; 34: 161 – 6
- Saaid M., Saad B., Hashim N. H., Ali A. S. M., Saleh M. I. (2009). Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. *Food Chemistry* 113:1356-1362.
- Sánchez, A. J; Capillas, R.C. (2012). Application of the simplex method for optimization of chromatographic analysis of biogenic amines in fish. Springer. *Eur Food Res Technol* (2012) 234:285–294.
- Santos, M. H. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Food Microbiology* 29:213-231.
- Schachter, E. N., Zuskin, E., Goswami, S., Castranova, V., Arumugam, U., Whitmer, M., Siegel, P., Chiarelli, A. e Fainberg, J. (2005). Pharmacological study of oyster

mushroom (*Pleurotus Ostreatus*) extract on isolated guinea pig trachea smooth muscle. *Lung*. 183: 63-71.

Seiler, N, in: *Handbook of Derivatives for Chromatography*, T edição (Editado por K. Blau e J. Halket - J. Wiley & Sons, London), Cap. 9 - Fluorescence derivatives, p. 175 (1993).

Shalaby, A.R. (1999). Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for determining biogenic amines in foods. *Food Chemistry* 65 (1999) 117±121.

Shalaby, A.R., Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research Internation* 29 (1996) 675-690.

Shruti Shukla, Hae-Kyong Park, Jong-Kyu Kim, Myunghee Kim. Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). *Food and Chemical Toxicology* 2010 48(5):1191-5.

Silva, T. (2009). *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.: defesas antioxidantes em diferentes estágios de diferenciação do basidioma. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina.

Spangenberg, B., Poole, Colin F. Weins, C. (2011). *Quantitative Thin-Layer Chromatography- A Practical Survey*. Springer.

Stamets, P. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. 3rd. ed. Berkeley, Calif.: Ten Speed Press, 2000.

Stamets, P.; Chilton, J. S. *The mushroom cultivator: a practical guide to growing mushrooms at home*. Olympia, Wash: Agarikon Press; Western distribution by Homestead Book Co., 1983.

Taveira V. C, e Novaes M.R.C.G. (2007). Consumption of mushrooms in human nutrition: a review of literature *Com. Ciências Saúde*. 2007; 18(4):315-322.

Touchstone, J.C. (1992). *Practice of Thin Layer Chromatography*. (3th Ed.). A. Wiley Interscience Publication.

Trabulsi, L.R. (1991). *Microbiologia*. 2ª Edição, Atheneu. São Paulo.

- Urban, A. F.; Oliviera, H. C. B.; Vieira, W.; Correia, M. J.; Uriartt, A. H. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. Brasília : Embrapa, 2001. 151 p.
- Vidal-Carou M.C., Latorre-Moratalla M.L., Bover-Cid S., Biogenic Amines. In Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis (2009) Taylor & Francis.
- Vidal-Carou, M.C., Latorre-Moratalla, M.L; Bover-Cid S.; Veciana-Nogués, T. (2009). Thin-layer chromatography for the identification and semi-quantification of biogenic amines produced by bacteria. Journal of Chromatography A, 1216 4128-4132.
- Vinci, G., Antonelli, M.L., 2002, “Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat”, Food Control, 13, 519–524.
- Vogel, A.I. "Análise Inorgânica Quantitativa", 4a. ed., revista por J. Bassett, R.C. Denney, G.H. Jeffery e J. Mendham, traduzida por A. Espínola, Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1986, cap.X, parte A.1, p. 178.
- Webster, J.; Weber, R. Introduction to fungi. 3rd. ed. Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press, 2007.
- Yang JH, Lin HC e Mau JL. Antioxidant properties of several commercial mushrooms Food Chemistry. 2002; 77: 229 – 235.

## Anexo

Os passos efetuados no programa *Image J* para a conversão da fotografia são os seguintes:

- i) no separador FILE, selecionar a opção “Open” permitindo ir buscar a imagem que se pretende tratar;
- ii) no separador IMAGE selecionar a opção “color” seguida de “split channels”, que permite ter 3 novas imagens em escala cinza (uma muito escura ,outra intermédia e outra muito clara) selecionando-se a imagem intermédia por permitir uma melhor visualização das manchas;
- iii) escolhida a melhor imagem, faz-se uma correção do “background” à imagem obtida. Neste estudo efetuou-se a correção “background” ao nível 70, visto apresentar mais sensibilidade e reduzir bastante o ruído nos picos do densitograma;
- iv) para se obter o densitograma seleciona-se a forma “Retangular” (ver opção selecionada na figura 9), que permite definir a secção da imagem a tratar;
- v) para retirar a densidade ótica da secção onde estão as manchas clicamos em CTRL 1 e CTRL 3, obtendo deste modo os densitogramas com os respetivos picos;
- vi) por fim, selecionamos a opção “Wand” para desenhar a base de cada pico e de imediato aparece uma folha com RESULTS, onde constam os valores das áreas pretendidas.