

Débora Cristina Sampaio de Assis

**AMINAS BIOATIVAS EM CARNE DE PEITO DE FRANGO E EM OVOS DE
CONSUMO PRODUZIDOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado.

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2014

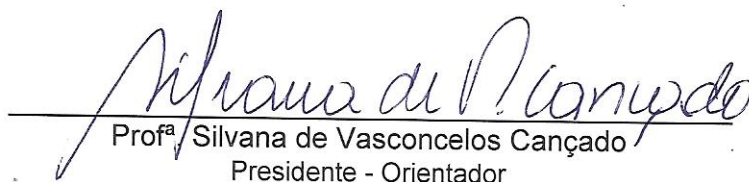
A848a Assis, Débora Cristina Sampaio de, 1987-
Aminas bioativas em carne de peito de frango e em ovos de consumo produzidos no estado de Minas Gerais / Débora Cristina Sampaio de Assis. – 2014.
75 p. : il.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Caçado
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Carne de frango – Análise – Teses. 2. Ovos – Análise – Teses. 3. Aminas – Teses.
4. Poliaminas – Teses. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. I. Caçado,
Silvana de Vasconcelos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
III. Título.

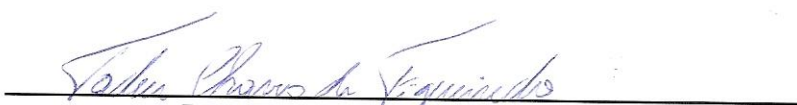
CDD – 664.9

Dissertação defendida e aprovada em 17 de janeiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof.ª Silvana de Vasconcelos Cançado
Presidente - Orientador


Prof. Marcelo Resende de Souza
Escola de Veterinária - UFMG


Dra. Liliane Denize Miranda Menezes
Instituto Mineiro de Agropecuária


Prof. Tadeu Chavés de Figueiredo
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

À Fundação Ezequiel Dias – FUNED.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À Deus, pela oportunidade e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais.

Aos meus pais, pela dedicação e ensinamentos que formaram meu caráter, em especial à minha mãe, pelo incentivo constante e por ter orgulho das minhas conquistas.

À minha vó Jovita, pelos conselhos, pela paciência, por sempre valorizar a educação e me apoiar em todos os momentos.

À todos os meus familiares, que durante esse tempo estiveram ao meu lado, pelo apoio e incentivo.

À Prof.^a Silvana, que foi mais que uma orientadora, minha eterna gratidão! Agradeço a oportunidade de trabalharmos juntas e de poder fazer parte desse grupo, e também pelo carinho, amizade e confiança.

À Liliane Menezes, minha “irmã” mais velha, que me recebeu de braços abertos no IMA e será minha eterna amiga de coração.

Ao Dr. Luiz Guilherme pelos ensinamentos, pela disponibilidade, pela confiança e por tornar possível a execução deste trabalho.

Aos amigos que auxiliaram na execução dos experimentos e tornaram esta caminhada mais leve: Aline Fioravante, Andréia, Anna Paula, Arina, Carla, Eronilda, Guilherme Marcondes, Guilherme Resende, Isabela Canhas, Isabela Lanza, Julieta, Luciana, Maria Clara, Ricardo, Roger.

Ao Prof. Wagner, pela amizade, pelos conselhos, ensinamentos e incentivo durante a graduação.

Ao Prof. Marcelo, que tanto contribuiu na minha formação profissional, pelo exemplo de professor dedicado e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao Prof. Tadeu, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e pela enorme contribuição nesse trabalho.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, em especial ao Miltinho e à Prof.^a Lílian.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, meu muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	17
2.1.1. Linearidade	18
2.1.2. Seletividade	19
2.1.3. Limite de detecção	19
2.1.4. Limite de quantificação	20
2.1.5. Precisão	20
2.1.6. Exatidão	21
2.2. AMINAS BIOATIVAS	21
2.2.1. Poliaminas	24
2.2.2. Aminas bioativas em alimentos e a importância dos micro-organismos em sua formação	25
2.2.3. Efeitos tóxicos das aminas	28
2.2.4. Aminas bioativas em carcaças de frangos de corte	29
2.2.5. Aminas bioativas em ovos	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.2. MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS	38
3.3. REAGENTES E PADRÕES	39
3.4. PREPARO DOS REAGENTES E PADRÕES	39
3.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS EM CARNE DE PEITO DE FRANGO	39
3.5.1. Preparo das amostras	39
3.5.2. Condições Cromatográficas	40
3.5.3. Procedimentos de Validação	40
3.5.3.1. Linearidade	41
3.5.3.2. Seletividade	41
3.5.3.3. Limites de detecção e quantificação	41
3.5.3.4. Precisão	41
3.5.3.5. Exatidão	41
3.6. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE AMINAS BIOATIVAS EM AMOSTRAS DE CARNE DE PEITO DE FRANGO E OVOS DE CONSUMO	42
3.6.1. Aminas bioativas em amostras de carne de peito de frango	42
3.6.2. Aminas bioativas no albúmen e gema de ovos de consumo	43
3.6.3. Temperatura e pluviosidade das mesorregiões do estado de Minas Gerais avaliadas	44
3.7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS EM CARNE DE PEITO DE FRANGO	46
4.1.1. Linearidade	46
4.1.2. Seletividade	48
4.1.3. Limite de detecção e quantificação	50
4.1.4. Exatidão e precisão	50
4.2. RESULTADOS DAS PESQUISAS DE AMINAS BIOATIVAS NAS AMOSTRAS DE CARNE DE PEITO DE FRANGO E NO CONTEÚDO INTERNO DE OVOS DE CONSUMO	51
4.2.1. Resultados das análises de aminas bioativas em carne de peito de frangos de corte	51
4.2.2. Resultados das análises de aminas bioativas no conteúdo interno dos ovos	60
5. CONCLUSÃO	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Aminoácidos e sua forma convertida em amina após a sua descarboxilação.....	11
Tabela 2	Valores de recuperação e coeficientes de variação considerados aceitáveis para resultados quantitativos.....	34
Tabela 3	Gradiente de eluição para as fases móveis água e acetonitrila utilizadas na determinação de aminas em frango.....	37
Tabela 4	Precipitação pluviométrica (mm) por estação do ano e por mesorregião durante os anos de 2010 e 2011.....	40
Tabela 5	Temperaturas máximas e mínimas por estação do ano e por mesorregião durante os anos de 2010 e 2011.....	40
Tabela 6	Municípios dos estabelecimentos sorteados por mesorregião de Minas Gerais e por sistema de fiscalização para frango.....	41
Tabela 7	Municípios dos estabelecimentos sorteados por mesorregião de Minas Gerais e por sistema de fiscalização para ovos.....	42
Tabela 8	Equações de regressão linear, coeficientes de determinação e de correlação das curvas analíticas para cada amina adicionada à matriz frango.....	46
Tabela 9	Limites de detecção e quantificação do método para a matriz frango.....	48
Tabela 10	Recuperações médias e coeficientes de variação de aminas na matriz frango.....	49
Tabela 11	Amostras de carne de peito de frango produzidas e comercializadas no estado de Minas Gerais e analisadas para os teores de aminas bioativas de acordo com os limites de detecção e quantificação do método.....	50
Tabela 12	Médias dos teores de putrescina (mg/100g) encontrados em carnes de peitos de frangos produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais.....	51
Tabela 13	Médias dos teores de cadaverina (mg/100g) encontrados em carnes de peitos de frangos produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais.....	53
Tabela 14	Médias dos teores de histamina (mg/100g) encontrados em carnes de peitos de frangos produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais.....	55

Tabela 15	Médias dos teores de tiramina (mg/100g) encontrados em carnes de peitos de frangos produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais.....	56
Tabela 16	Médias dos teores de espermidina (mg/100g) encontrados em carnes de peitos de frangos produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais.....	58
Tabela 17	Médias dos teores de espermina (mg/100g) encontrados em carnes de peitos de frangos produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais.....	59
Tabela 18	Limites de detecção e quantificação do método para as matrizes gema e albúmen.....	61
Tabela 19	Amostras de ovos de consumo produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais e analisados para os teores de aminas bioativas de acordo com os limites de detecção e quantificação do método.....	62
Tabela 20	Médias dos teores de feniletilamina (mg/100g) encontrados no conteúdo interno de ovos produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais.....	62
Tabela 21	Médias dos teores de putrescina (mg/100g) encontrados nas gemas de ovos produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais.....	63
Tabela 22	Médias dos teores de putrescina (mg/100g) encontrados no albúmen de ovos produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais.....	64
Tabela 23	Médias dos teores de cadaverina (mg/100g) encontrados no conteúdo interno de ovos produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais.....	65
Tabela 24	Médias dos teores de histamina (mg/100g) encontrados no conteúdo interno de ovos produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais.....	67
Tabela 25	Médias dos teores de tiramina (mg/100g) encontrados no conteúdo interno de ovos produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais.....	67
Tabela 26	Médias dos teores de espermidina (mg/100g) encontrados no conteúdo interno de ovos produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aminas bioativas de acordo com sua estrutura química.....	12
Figura 2	Vias biossintéticas de agmatina, putrescina, espermidina e espermina.	13
Figura 3	Síntese e interconversão das poliaminas (DAO, diamina oxidase; GABA, ácido γ -aminobutírico; ODC, ornitina descarboxilase; PAO, poliamina oxidase; SAM, S-adenosilmetionina; SAM-DC, S-adenosilmetionina descarboxilase; SAM-HC, S-adenosilmetionina homocisteamina).....	14
Figura 4	Divisão de Minas Gerais em mesorregiões e suas respectivas microrregiões e municípios correlatos.....	41
Figura 5	Curvas de linearidade das aminas adicionadas à matriz frango na faixa de 0,09 a 9,44 mg/100g.....	45
Figura 6	Adição de solução padrão à água (1,12 mg/100g).....	46
Figura 7	Frango sem adição de solução padrão.....	47
Figura 8	Adição de solução padrão ao frango (9,44 mg/100g).....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
CV	Coefficiente de variação
DAO	Diaminoxidase
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DPR	Desvio padrão relativo
EC	Comunidade Europeia
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GABA	Ácido γ-aminobutírico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
Kg	Quilograma
L	Litro
LD	Limite de detecção
LGC	Laboratory of the Government Chemist
LQ	Limite de quantificação
LSMA	Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos
MAO	Monoaminoxidase
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
min	Minuto
μL	Micro litro
μM	Micrômetro
μMol	Micromol
N ₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
ND	Não detectado
NIST	National Institute of Standards and Technology
nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
ODC	Ornitina descarboxilase
PA	Puro para análise
PAO	Poliaminoxidase
ppb	Partes por bilhão
PTFE	Politetrafluoretileno
r	Coefficiente de correlação
R ²	Coefficiente de determinação
RPM	Rotações por minuto
SAM	S-adenosilmetionina
SAM-DC	S-adenosilmetionina descarboxilase
SAM-HC	S-adenosilmetionina homocisteamina
SIE	Sistema de Inspeção Estadual
SIF	Sistema de Inspeção Federal
TCA	Ácido tricloroacético
TR	Traços
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UFC	Unidades formadoras de colônia
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UV	Ultravioleta

RESUMO

Com o objetivo de avaliar os níveis de aminos bioativas encontrados nos produtos de origem avícola produzidos em Minas Gerais foram coletadas, pelos serviços de inspeção estadual e federal, 56 amostras de ovos de consumo e 160 amostras de peitos de frangos de corte provenientes de cinco regiões distintas do estado. Foram pesquisadas as aminos: feniletilamina (somente em ovos comerciais), putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina. A metodologia analítica, realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi validada e os resultados demonstraram alta seletividade e separação de todas as aminos, linearidade (coeficiente de correlação maior que 0,99), alto índice de recuperação, limites de detecção baixos e de quantificação entre 0,09 e 0,1 mg/100g. Os resultados encontrados nas análises das amostras de peito de frango demonstraram a presença das aminos espermidina e espermina, em todas as amostras, em concentrações que variavam entre 1,868-6,219 mg/100g e 4,915-6,496 mg/100g, respectivamente. As aminos putrescina, cadaverina, histamina e tiramina também foram detectadas em baixas concentrações nos cortes de peito de frango. Nas amostras de ovos foram detectadas em baixas concentrações as aminos putrescina, cadaverina, feniletilamina, histamina, tiramina e espermidina. A putrescina foi detectada em todas as amostras e a cadaverina foi a segunda amina mais predominante nos ovos. Foi concluído que os teores de aminos encontrados, tanto nos peitos de frango quanto nos ovos de consumo, foram baixos, e não representam riscos à saúde do consumidor e que a carne de frango é uma fonte importante de poliaminas, em especial, a espermidina e a espermina.

Palavras-chave: Aminos bioativas, carne de frango de corte, ovos de consumo, validação, CLAE-UV. Aminos bioativas, frango, ovos, validação, CLAE-UV

ABSTRACT

In order to evaluate the levels of bioactive amines in poultry products produced in Minas Gerais were collected, by state inspection service and federal, 56 samples of commercial eggs and 160 samples of broiler chicken breast from the five regions of the state. The amines: phenylethylamine (only in commercial eggs), putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine and spermine were determined. The analytical method, by high performance liquid chromatography (HPLC), was validated and the results showed high selectivity and separation of all amines, linearity (correlation coefficient more than 0,99), high recovery index, low limits of detection and limits of quantification between 0,09 and 0,1mg/100g. The results of the analyzes of chicken breast samples showed the presence of amines spermidine and spermine in all samples, at concentrations between 1,868-6,219mg/100g and 4,915-6,496mg/100g, respectively. The amines putrescine, cadaverine, histamine and tyramine were also found, but in low concentrations in the chicken breast. In the samples of commercial eggs, were detected in low concentrations the amines putrescine, cadaverine, phenylethylamine, histamine, tyramine and spermidine. Putrescine was detected in all samples and cadaverine was the second most prevalent amine in the eggs. It was concluded that amine levels found, both in the chicken breasts and in eggs, were low and do not represent risks to consumer health and that the chicken meat is na important source of polyamines, especially spermidine and spermine.

Keywords: Bioactive amines, chicken broiler meat, commercial eggs, validation, HPLC-UV.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira passou por profundas transformações, especialmente nos últimos 30 anos, colocando o país em posição de destaque no *ranking* mundial de produção de carnes de aves e de ovos. Esses avanços devem-se, principalmente, à evolução nas áreas de seleção genética e manejo das aves. No ano de 2012, o Brasil teve uma produção de 2,65 bilhões de dúzias de ovos e o consumo *per capita* foi de 161,53 unidades/ano. Em relação à carne de frango, o Brasil ocupa atualmente o terceiro lugar no *ranking* mundial, com uma produção de 12,645 milhões de toneladas em 2012, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China. Do volume total de frangos produzido pelo país, 69% foi destinado ao consumo interno, e 31% para exportações. O consumo *per capita* de carne de frango no Brasil em 2012, atingiu 45 quilos por pessoa. A exportação de 3,92 milhões de toneladas de carne de frango em 2012 manteve o Brasil como maior país exportador (UBABEF, 2013).

O ovo é um alimento de alto valor nutricional, que tem em sua constituição aminoácidos essenciais para a saúde humana, além de vitaminas, principalmente as do complexo B, e minerais, como fósforo e zinco. A carne de frango também possui um alto valor nutricional, sendo rica em proteínas, vitaminas e sais minerais. Porém, para que não tragam riscos à saúde do consumidor, esses produtos exigem alguns cuidados que devem ter início na produção da matéria-prima, passando

pela manipulação industrial, até chegar ao armazenamento e exposição à venda.

Para garantir o crescimento do setor avícola, é preciso aliar um preço competitivo a produtos de alta qualidade, pois o consumidor, cada vez mais exigente, não utiliza apenas o preço e as propriedades nutricionais dos alimentos como critério de decisão no momento em que vai adquirir o produto. Dessa forma, tem-se buscado cada vez mais a utilização de índices que possam avaliar a qualidade dos alimentos e o desenvolvimento de metodologias capazes de detectar componentes tóxicos, para assegurar que eles não apresentem nenhum tipo de perigo, sejam eles de natureza química, física ou biológica.

Nesse sentido, a validação de métodos analíticos tem papel fundamental, pois sempre que um método totalmente novo é desenvolvido, ela deve ser realizada, visando garantir que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas e assegurar a confiabilidade dos resultados.

As aminas bioativas, que são compostos orgânicos nitrogenados em que um dois ou três átomos de hidrogênio da amônia são substituídos por radicais alquila ou arila, são naturalmente encontradas em baixos níveis em tecidos animais e vegetais, podendo ser formadas e degradadas como resultado da atividade metabólica normal de animais, vegetais e de micro-organismos. Desta maneira, elas são encontradas em diversos alimentos como peixes, carnes, ovos,

queijos, frutas, legumes, cervejas e vinhos.

A ingestão de alimentos com elevados teores de amins pode causar danos à saúde, podendo ocorrer intoxicação histamínica, enxaqueca ou crise hipertensiva (Shalaby, 1996; Lima e Glória, 1999; Kalač e Krausová, 2005).

Deste modo, a pesquisa de amins biogênicas é importante não só pela sua toxicidade, mas também pelo fato de elas poderem ser usadas como indicadores de qualidade dos alimentos. O objetivo desse trabalho foi realizar a validação de um método por CLAE-UV para pesquisa dos níveis de amins bioativas em carne de peito de frango e ovos de consumo e avaliar a influência das estações do ano e das diferentes mesorregiões do estado de Minas Gerais sobre os teores de amins bioativas nestes produtos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos tem como objetivo demonstrar que um método de ensaio, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para assegurar a obtenção de resultados com a qualidade exigida, garantindo confiabilidade dos resultados. Este processo é necessário quando o método a ser empregado ainda não é reconhecido e aprovado por órgãos reguladores e deve ser realizado sempre que um método existente for modificado para atender a requisitos específicos, ou quando um método totalmente novo for desenvolvido visando assegurar que as

características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas. Nestes casos, todas as variáveis do método devem ser consideradas, incluindo procedimento de amostragem, preparo da amostra, manipulação dos insumos e equipamentos, análise laboratorial propriamente dita, interpretação e análise dos dados. (Lanças, 2004; Ribani et al., 2007; Souza, 2007; INMETRO, 2011).

Há vários procedimentos distintos para validação, dependendo da finalidade do procedimento, com discordâncias entre os diferentes sistemas de validação. De forma sutil, observa-se que, no Brasil, os critérios sugeridos pela ANVISA não coincidem na íntegra com aqueles preconizados pelo MAPA. Desta forma, há um consenso de que não há um sistema único de validação que atenda às exigências dos diferentes órgãos nacionais e internacionais de avaliação da qualidade de laboratórios de análise. Apesar da discrepância quanto a alguns aspectos, a maioria das instituições responsáveis pela qualidade de dados gerados em laboratórios analíticos concorda sobre a necessidade de adoção de alguns critérios fundamentais para a validação de metodologia de análise (Lanças, 2004).

De uma maneira geral, existem dois tipos de validação de métodos. A primeira é a validação no laboratório, também conhecida como “*in house validation*”, que consiste nas etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente, seja para verificar se um

determinado método está sendo bem conduzido. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade. A segunda é conhecida como validação completa, ou “*full validation*”, e envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Pode-se considerar a validação no laboratório como sendo uma etapa preliminar à validação completa (Thompson et al., 2002; Ribani et al. 2007).

Para se realizar o processo de validação são utilizadas características de desempenho tais como linearidade, especificidade/seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez (Thompson et al., 2002; Brito et al., 2003; ICH, 2005).

2.1.1. Linearidade

A linearidade é a capacidade do método de obter resultados diretamente proporcionais à quantidade do analito presente na amostra, em um intervalo especificado (EURACHEM, 1998; Thompson et al., 2002). A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e é

verificada a partir de uma equação de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Em geral, são necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicatas deve ser, no mínimo, de duas a sete em cada nível de concentração (Souza, 2007; INMETRO, 2011). Para as análises em nível de traços, é recomendado adotar o limite de quantificação como a concentração mais baixa da curva analítica (INMETRO, 2011).

A equação da reta que relaciona resposta obtida no ensaio em função da concentração do analito é:

$$y = a + bx$$

Sendo:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y, quando x = 0;

b = inclinação da curva analítica (sensibilidade).

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que

0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (Ribani et al., 2007).

2.1.2. Seletividade

A seletividade relaciona-se à capacidade que o método possui em identificar o composto em pesquisa mesmo na presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Significa que o valor medido provém somente do analito, assegurando que não há interferentes (ICH, 2005; ANVISA, 2003).

A seletividade pode ser avaliada através de ensaios com padrões ou materiais de referência, análise de amostras com e sem a presença do analito (padrão) ou utilização de outra técnica específica para a substância de interesse que permite comprovar a seletividade (INMETRO, 2011).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse. Se a seletividade não for assegurada, alguns parâmetros como linearidade, exatidão e precisão serão seriamente comprometidos (Ribani et al., 2007).

2.1.3. Limite de detecção

O limite de detecção é a mínima quantidade do analito que pode ser detectada pelo método analítico, mas não necessariamente quantificada (EURACHEM, 1998; Thompson et al., 2002). Existem várias maneiras de se determinar o limite de detecção, dentre eles, o método visual, método da relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica.

O método visual baseia-se na adição de concentrações conhecidas do analito, de modo a distinguir sinal analítico de ruído, pela visualização da menor concentração visível que pode ser confiavelmente detectado. O método da relação sinal-ruído só pode ser aplicado aos procedimentos analíticos que apresentam ruído da linha de base e é realizada comparando sinais medidos a partir de amostras com baixas e conhecidas concentrações do analito com os sinais de amostras em branco. Geralmente, um sinal-ruído entre 3:1 ou 2:1 é considerado aceitável para a estimativa do limite de detecção (Brito et al., 2003; ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

A determinação do limite de detecção é feita com base no desvio padrão da resposta e na inclinação ou coeficiente angular da curva analítica. Assim o limite de detecção pode ser calculado como:

$$LD = 3,3 \times \sigma / S$$

Em que:

LD = limite de detecção

σ = desvio padrão da resposta

S = inclinação da curva analítica

Para calcular o desvio padrão pode-se utilizar as respostas obtidas após a análise de amostras brancas ou utilizar o desvio padrão das amostras da equação de regressão (ICH, 2005).

2.1.4. Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis pelo método analítico (Thompson et al., 2002; EURACHEM, 1998).

A forma de determinação do limite de quantificação é bastante semelhante à utilizada para o limite de detecção e também pode ser feita pelo método visual, método da relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica. Entretanto, a relação sinal-ruído deve ser de 10:1 e na equação usada para determinação do limite de detecção pelos parâmetros da curva analítica ao invés de utilizar 3,3, a multiplicação é feita por 10 (ICH, 2005), sendo:

$$LQ = 10 \times \sigma / S$$

Em que:

LQ = limite de quantificação

σ = desvio padrão da resposta.

S = inclinação da curva analítica.

Segundo Ribani et al. (2004) o método mais utilizado para estimar o limite de detecção e quantificação é o da relação sinal-ruído, porém em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas, a medição do ruído não é rotineira e muitas vezes pode ser subjetiva. Além disso, tanto o limite de detecção quanto

o limite de quantificação podem ser afetados pelas condições cromatográficas. Picos maiores aumentam a relação sinal-ruído, resultando em limite de detecção e quantificação mais baixos. O melhor caminho para resolver este problema do cálculo do limite de detecção e limite de quantificação é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. Desse modo, a curva analítica deve conter a concentração correspondente ao limite de quantificação.

2.1.5. Precisão

A precisão é a proximidade dos resultados obtidos em várias medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra e pode ser expressa em desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) (ANVISA, 2003; Lanças, 2004).

A precisão pode ser avaliada em condições de repetitividade ou reprodutibilidade. A repetitividade é caracterizada pela utilização dos resultados obtidos por análises sucessivas da mesma amostra em curtos intervalos de tempo, usando um mesmo método e efetuadas sob as mesmas condições (laboratório, equipamentos e mesmo analista). Quando os resultados avaliados são obtidos utilizando uma mesma amostra e método, mas em diferentes laboratórios, equipamentos e analistas, essa avaliação da precisão é chamada de reprodutibilidade (Lanças, 2004).

Desse modo, a repetitividade é expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito na amostra, em várias concentrações dentro da faixa de trabalho. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método. A faixa de valor aceitável de acordo com a concentração do analito na amostra pode variar de 2% (concentração do analito igual a 1) a 45% no caso da concentração estudada for de 10^{-9} ou em partes por bilhão (ppb) (INMETRO, 2011).

2.1.6. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos em relação ao verdadeiro valor contido na amostra, exprimindo a compatibilidade

do valor aceito com o valor de referência (Thompson et al., 2002; Lanças, 2004). A exatidão pode ser determinada com o uso de materiais de referência certificados fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como por exemplo: INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia), NIST (*National Institute of Standards and Technology* - USA), LGC (*Laboratory of the Government Chemist* - UK). Outras formas de se avaliar a exatidão são através da participação em ensaios interlaboratoriais ou a realização de ensaios de recuperação, em que as amostras são fortificadas com quantidades conhecidas do analito e os resultados são comparados em relação à quantidade real presente na amostra (INMETRO, 2011).

A tabela 2 apresenta os valores estabelecidos para os parâmetros recuperação (%) e coeficientes de variação de acordo com o proposto por EC (2002) e Codex Alimentarius (2009).

Tabela 2. Valores de recuperação e coeficientes de variação considerados aceitáveis para resultados quantitativos

Concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recuperação (%)	Coefficiente de variação (%)
≤ 1	50 a 120	35
> 1 a ≤ 10	60 a 120	30
> 10 a ≤ 100	70 a 120	20
> 100 a ≤ 1000	70 a 110	15
> 1000	70 a 110	10

2.2. Aminas bioativas

As aminas bioativas são bases orgânicas de baixo peso molecular e que possuem atividade biológica. Elas podem ser

classificadas em poliaminas e aminas biogênicas. As poliaminas estão envolvidas no crescimento e regeneração celular, enquanto que as aminas biogênicas podem ser formadas durante

a estocagem ou processamento de produtos alimentícios pela descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas (Brink et al., 1990; Lima e Glória, 1999; Salazar et al., 2000).

As aminas bioativas são formadas por transaminação de aldeídos ou cetonas, hidrólise de substâncias nitrogenadas, decomposição de fosfolipídios, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos, sendo esta última a principal via de formação. A descarboxilação de aminoácidos ocorre pela remoção do grupo α -carboxila formando a amina correspondente (Tab. 1). Deste modo, a arginina pode facilmente se converter em agmatina e a ornitina pode sofrer descarboxilação através da atividade

bacteriana e formar putrescina. Devido à ação bacteriana, a lisina pode se transformar em cadaverina. A tiramina, triptamina e feniletilamina podem ser formadas a partir de tirosina, triptofano e fenilalanina, respectivamente. A histidina sob certas condições pode sofrer descarboxilação e se transformar em histamina (Halász et al., 1994; Shalaby, 1996).

Vários índices de qualidade química baseados no conteúdo de aminas bioativas já foram propostos para alimentos, como o uso de aminas como índice de qualidade de pescados (Veciana-Nogués et al., 1997), de carnes de frango (Silva e Glória, 2002; Moreira et al., 2008) e de cerveja (Loret et al., 2005).

Tabela 1. Aminoácidos e sua forma convertida em amina após a sua descarboxilação

Outra fonte	Aminoácido sob ação bacteriana	Amina formada
	Arginina	→ Agmatina
	Ornitina	→ Putrescina
	Lisina	→ Cadaverina
	Tirosina	→ Tiramina
	Triptofano	→ Triptamina
	Fenilalanina	→ Feniletilamina
Mastócito e Basófilo	Histidina	→ Histamina
Células de grande replicação celular	→	{ Agmatina } { Putrescina } { Espermina } { Espermidina }

Fonte: Adaptado de Halász et al., 1994; Shalaby, 1996

A quantidade e tipo de amina encontrada em um alimento dependem da natureza do alimento e da sua microbiota. Alguns micro-organismos como enterobactérias, lactobacilos, pediococos e enterococos

são particularmente ativos na formação de aminas biogênicas. O crescimento desses micro-organismos e o aumento nos teores de aminas bioativas durante o armazenamento dos alimentos pode

representar perda de qualidade, principalmente de produtos com elevado teor de proteínas (Coutts et al., 1986; Silva e Glória, 2002; Theron et al., 2003; Jones et al., 2004).

As aminas podem ser classificadas, em relação à via biossintética, em aminas biogênicas e naturais. As biogênicas são formadas pela descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas. Fazem parte deste grupo a histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina. As aminas naturais, espermina e espermidina, são formadas *in situ* nas células à medida que são requeridas, sendo a agmatina e a putrescina intermediárias. A histamina além de ser classificada como biogênica também pode ser classificada como natural, pois é armazenada nos mastócitos e basófilos

(Bardócz, 1995; Shalaby, 1996; Lima e Glória, 1999).

As aminas também são classificadas de acordo com o número de grupamentos amina e de sua estrutura química (Fig. 1). Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, são classificadas em monoaminas (tiramina, feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermina, espermidina e agmatina) (Smith, 1980-1981; Bardócz, 1995; Silla-Santos, 1996). De acordo com a estrutura química, as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) e heterocíclicas (histamina, triptamina) (Silla-Santos, 1996; Salazar et al., 2000).

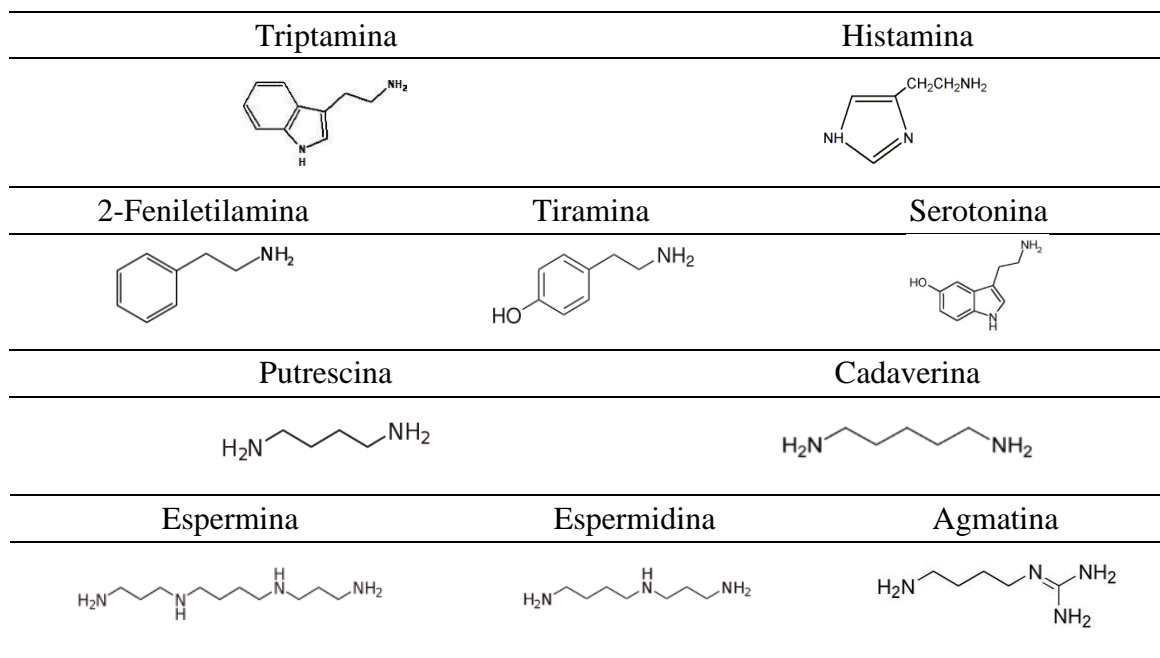


Figura 1. Aminas bioativas de acordo com sua estrutura química

2.2.1. Poliaminas

As poliaminas, putrescina, espermidina e espermina, formadas endogenamente pelas células e também obtidas da dieta, têm despertado o interesse de pesquisadores, pois, entre suas funções biológicas, estão a participação no crescimento e proliferação celular através da regulação da função de ácidos nucléicos e síntese de proteínas, podendo estar envolvidas no processo de desenvolvimento de tumores (Bardócz, 1995; Kalač e Krausová, 2005). Os requisitos de poliaminas são maiores durante os períodos de intenso crescimento, como na adolescência, mas também durante o envelhecimento devido à diminuição da atividade das enzimas participantes na síntese das poliaminas. Órgãos com altas taxas de reposição celular como o trato gastrointestinal, pâncreas e baço, foram reconhecidos como dependentes das poliaminas ingeridas na alimentação. Do mesmo modo, um aumento da ingestão de poliaminas na dieta parece ser favorável na recuperação de pacientes no pós-operatório ou durante a cicatrização de feridas (Kalač, 2006). A depleção de poliaminas inibe a proliferação celular ou pode causar o desenvolvimento de fetos defeituosos, enquanto que um acúmulo exagerado induz apoptose e transformação celular (Moinard et al., 2005).

Segundo Cipolla et al. (2007), anormalidades no metabolismo de poliaminas podem estar envolvidas em diversos processos patológicos, incluindo o câncer. Entretanto, segundo Larqué et al. (2007), dietas com alto

conteúdo de poliaminas podem desempenhar papel importante na recuperação da microbiota intestinal e da mucosa intestinal devido a sua influência sobre os processos de reparação tecidual.

Foram identificadas três fontes de poliaminas: a biossíntese *in situ* a partir da arginina via ornitina, com a ornitina descarboxilase como a enzima-chave, formando inicialmente putrescina (Fig. 2); a síntese e liberação pela microbiota gastrointestinal e a ingestão direta na dieta. A dieta é uma importante fonte de fornecimento de, pelo menos, uma parte da demanda necessária de poliaminas para sustentar o metabolismo normal (Kalač, 2006). Segundo Bardócz et al. (1993), a ingestão diária recomendada de poliaminas para um adulto varia entre 350 a 550 μMol , o que equivale a 50,8 a 79,9 mg de espermidina ou 70,8 a 111,3 mg de espermina.

A putrescina pode ser formada endogenamente, a partir da ornitina por uma reação catalisada pela enzima ornitina descarboxilase (ODC). A espermidina é formada a partir da putrescina e requer duas enzimas: a S-adenosilmetionina descarboxilase (SAM-DC) que descarboxila a S-adenosilmetionina (SAM); e a espermidina sintetase, uma aminopropil transferase que transfere o grupo propilamina derivado da SAM descarboxilada à putrescina para formar espermidina (Jeevanandam e Petersen, 2001). A espermidina é igualmente convertida em espermina pela enzima espermina sintetase, que adiciona um segundo grupo propilamina derivado da SAM descarboxilada à espermidina. As

sínteses de espermidina e espermina são condicionadas à disponibilidade de um aminoácido essencial, a metionina, o precursor da SAM pela sua condensação com o ATP na presença de íons Mg^{2+} . O

teor de poliaminas intracelulares é fortemente regulado pela atividade de duas enzimas-chave, a ODC e a SAM-DC (Larqué et al., 2007; Moinard et al., 2005).

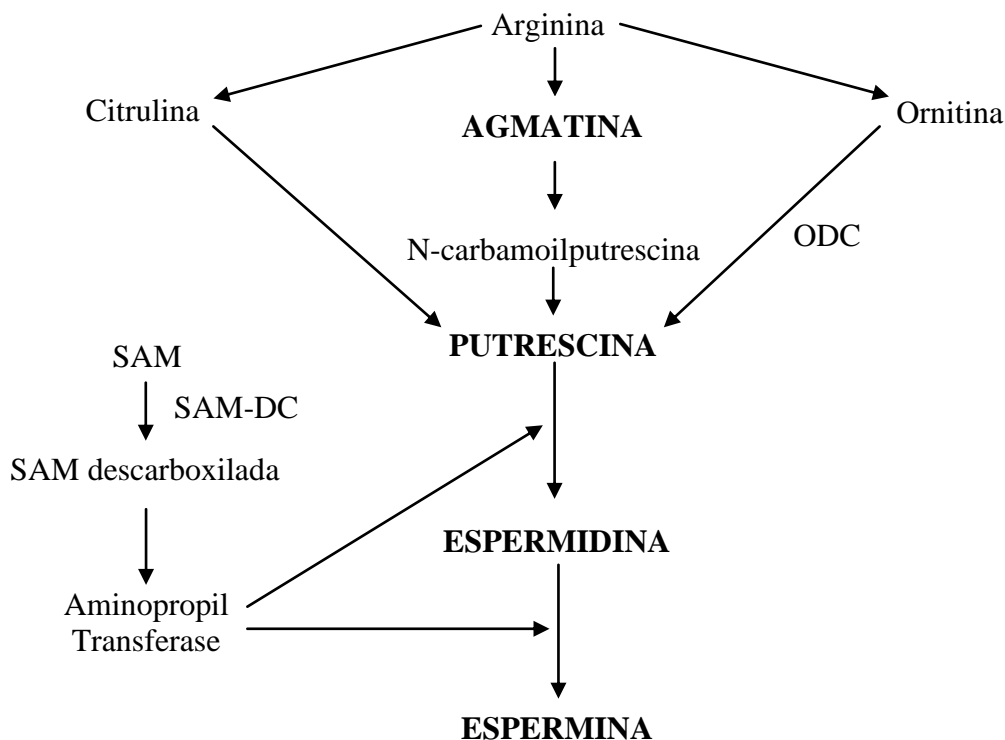


Figura 2. Vias biossintéticas de agmatina, putrescina, espermidina e espermina

A interconversão das poliaminas (Fig. 3) acontece por duas reações associadas: a acetilação, mediada pela ação da espermidina/espermina N^1 -acetiltransferase (SSAT) e a clivagem através da ação de uma enzima, a poliaminoxidase (PAO). As reações de acetilação são os principais mecanismos usados pelas células para controlar o acúmulo intracelular de poliaminas (Larqué et al., 2007; Moinard et al., 2005).

2.2.2. Aminas bioativas em alimentos e a importância dos micro-organismos em sua formação

Em alimentos é frequente a observação de aminas como a histamina, putrescina, cadaverina, espermina, espermidina, agmatina, tiramina, feniletilamina e triptamina (Shalaby, 1996; Min et al., 2007). As poliaminas espermidina e espermina são encontradas principalmente em matérias-primas, enquanto que a quantidade de putrescina

aumenta devido à atividade bacteriana durante o processamento e armazenamento inadequado de alimentos de origem animal (Kalač e Krausová, 2005). Como a alta concentração dessas substâncias em alimentos pode ser devido a ação de enzimas bacterianas ou pela atividade descarboxilase de

bactérias, elas podem ser usadas como indicador da qualidade de alimentos (Halász et al., 1994) e a prevenção do crescimento bacteriano seria muito importante para controlar o teor de aminas em alimentos (Silla-Santos, 1996).

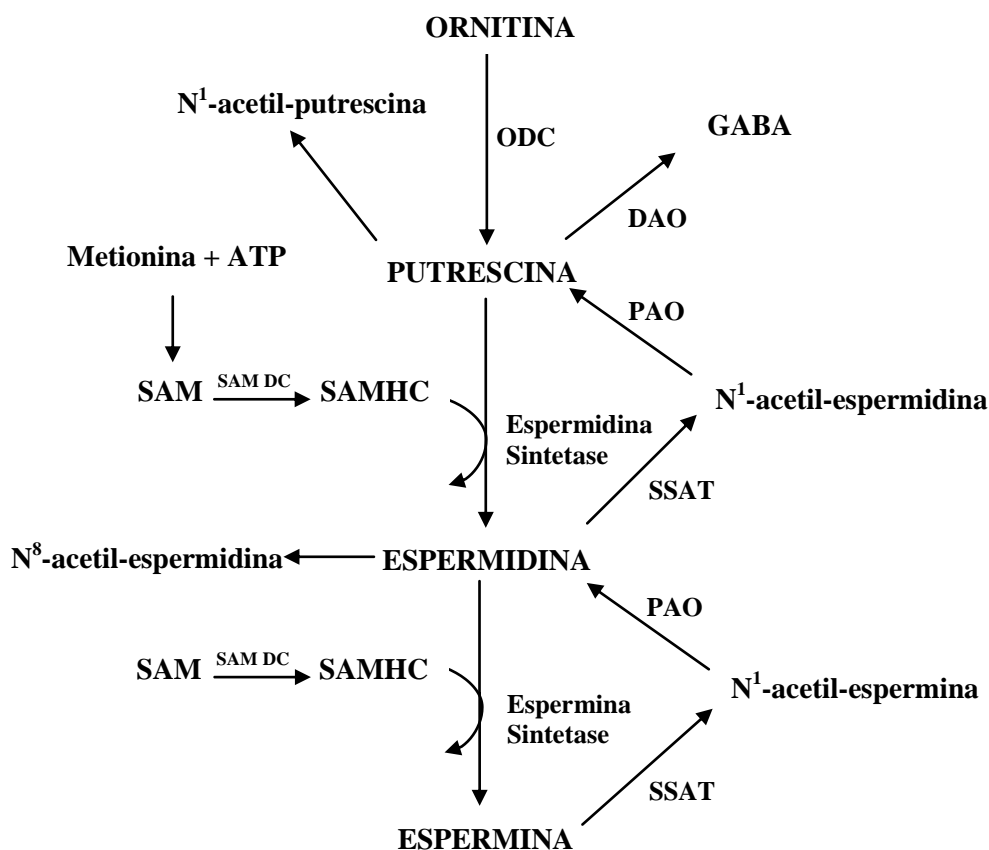


Figura 3. Síntese e interconversão das poliaminas. DAO, diaminoxidase; GABA, ácido γ -aminobutírico, ODC, ornitina descarboxilase; PAO, poliaminoxidase; SAM, S-adenosilmetionina, SAM-DC, S-adenosilmetionina descarboxilase; SAM-HC, S-adenosilmetionina homocisteamina; SSAT, espermidina/espermina N¹-acetil-transferase (Moinard et al., 2005; Larqué et al., 2007).

A formação de aminas em alimentos tem como pré-requisitos a disponibilidade de aminoácidos livres, a presença de micro-organismos descarboxilase positivos e

condições favoráveis que permitam o crescimento bacteriano (pH, temperatura de armazenamento, concentração de oxigênio, fonte de nutrientes, atividade

de água, concentração de aminoácidos livres e de carboidratos fermentáveis, presença de vitaminas e coenzimas) e a síntese e a atividade das enzimas descarboxilase (Shalaby, 1996). Normalmente, aminoácidos livres estão presentes em alimentos, mas também podem ser provenientes de proteínas como resultado da atividade de micro-organismos proteolíticos. Micro-organismos descarboxilase positivos podem fazer parte da microbiota associada ao alimento ou podem ser introduzidos por contaminação antes, durante ou após o processamento (Halász et al., 1994). Apesar de as aminas serem normalmente formadas durante o processo de decomposição ou deterioração (envolvendo formação de aminoácidos livres por proteólise e ação de enzimas descarboxilase na presença de micro-organismos), altos níveis de histamina podem ser formados antes dos alimentos apresentarem características organolépticas ruins ou inaceitáveis, predispondo o seu consumo por parte do homem (Shalaby, 1996; ICMSF, 2005).

Silla-Santos (1998) observou que bactérias de várias espécies apresentaram capacidade de descarboxilar aminoácidos e segundo este autor, os micro-organismos *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus xylosum*, *Lactobacillus curvatus* e *Hafnia alvei* apresentaram atividade histidina descarboxilase positiva, já a tirosina foi descarboxilada por bactérias das espécies *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens* e *Staphylococcus saprophyticus*. A ornitina foi descarboxilada pelas bactérias

Enterobacter aerogenes, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens* e *Micrococcus varians* e a lisina pela *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* e *Serratia liquefaciens*. As bactérias da família Enterobacteriaceae apresentaram maior atividade na descarboxilação de aminoácidos que as bactérias ácido lácticas, os micrococcos e os estafilococos.

Lima e Glória (1999) relataram que inúmeras bactérias são produtoras de aminas, principalmente as representantes da família Enterobacteriaceae, particularmente os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus* ao lado de espécies dos gêneros *Achromobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* e *Clostridium*.

Segundo Glória (2005), a presença de cadaverina em amostras deterioradas poderia indicar contaminação por enterobactérias, pois elas são capazes de descarboxilar a lisina.

Halász et al. (1994) relataram que o pH ótimo para ocorrência da descarboxilação de aminoácidos varia entre 2,5 a 6,5, além disso, o crescimento de bactérias em meio ácido estimula a síntese das enzimas descarboxilases.

Peña (2006) ao analisar amostras de salames tipo Italiano, verificou que o pH de 4,6 a 4,9 encontrado nas amostras foi favorável a produção de altas concentrações de histamina (entre 93 e 145 mg.Kg⁻¹) e de tiramina (entre 67 e 71 mg.Kg⁻¹). Segundo o autor, estes

valores de pH foram um fator importante para influenciar o metabolismo dos micro-organismos e originar enzimas descarboxilases que determinaram os níveis dessas aminas.

2.2.3. Efeitos tóxicos das aminas

Embora algumas aminas como histamina, tiramina, putrescina, espermina e espermidina sejam necessárias para a realização de muitas funções fisiológicas nos homens e animais, o consumo de alimentos contendo altas quantidades destas aminas pode causar efeitos tóxicos. A toxicidade das aminas biogênicas depende da resposta individual de cada pessoa e a presença simultânea de cofatores como outras aminas, consumo de álcool ou produtos farmacêuticos que podem agir sinergicamente ou como antagonistas (Min et al., 2007). A sintomatologia clínica da intoxicação por aminas varia de acordo com a amina ingerida, podendo causar crises hipotensivas ou hipertensivas, taquicardia, bradicardia, salivação, lacrimejamento, aumento da frequência respiratória e dor de cabeça.

A intoxicação por histamina é a mais frequente intoxicação causada por aminas biogênicas e apresenta como sintomas a urticária, inflamação localizada, edema, náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, hipotensão, dor de cabeça, rubor e taquicardia (Shalaby, 1996; Lima e Glória, 1999).

Os efeitos farmacológicos da tiramina no organismo são a vasoconstrição periférica, aumento do débito cardíaco, lacrimejamento e salivação, aumento da frequência respiratória, aumento do nível

de açúcar no sangue, liberação de noradrenalina no sistema nervoso simpático e enxaqueca. A duração dos sintomas pode variar de 10 minutos a 6 horas. Podem ocorrer também alterações visuais, vômitos, contração muscular, confusão mental ou excitação. Dores no peito simulando angina pectoris, falha coronariana grave, edema pulmonar e hemorragia cerebral já foram relatados. (Shalaby, 1996; Glória e Vieira, 2007). Em pacientes em tratamento com inibidores da MAO, a tiramina pode causar enxaqueca, induzir hemorragia cerebral e parada cardíaca (Maga, 1978; Smith, 1980-1981; Maijala et al., Lehane e Olley, 2000).

Hipotensão, bradicardia, contração exagerada dos músculos da mandíbula, paralisia das extremidades e potencialização da toxicidade de outras aminas são os efeitos observados na cadaverina e putrescina, enquanto a feniletilamina causa liberação de noradrenalina no sistema nervoso simpático, aumento da pressão arterial e enxaqueca. Segundo Shalaby (1996) a triptamina pode levar ao aumento da pressão arterial.

O nível tóxico de aminas bioativas é difícil de ser estabelecido porque depende da eficiência dos mecanismos de detoxificação de diferentes indivíduos, da presença de substâncias potencializadoras nos alimentos, do consumo de drogas inibidoras da oxidase e de álcool e da presença de doenças gastrintestinais (Shalaby, 1996). Brink et al. (1990), baseando-se nas concentrações de histamina encontradas em produtos envolvidos em

intoxicações, sugerem que a dose tóxica para que ocorra intoxicação por esta amina está entre 50 e 100mg/100g. Pouco se sabe sobre a dose tóxica de outras aminas. Os limites máximos de 10mg/100g de histamina, 10-80mg/100g de tiramina e de 3mg/100g de feniletilamina em alimentos tem sido sugeridos (Brink, et al., 1990).

O organismo de indivíduos saudáveis pode rapidamente metabolizar as aminas ingeridas por acetilação e reações de oxidação mediadas por enzimas como a MAO (monoaminoxidase), DAO e PAO. Na presença de íons cobre (Cu^{2+}), essas enzimas aminoxidases degradam as poliaminas devido a deaminação oxidativa de seu grupo amino primário e seus derivados N-acetil, convertendo-os em produtos de degradação fisiologicamente inativos (Bardócz, 1995; Seiler, 2004; Moinard et al., 2005). No entanto, no caso de indivíduos alérgicos, na presença de inibidores das aminoxidases ou da ingestão de elevados níveis de aminas, o processo de metabolização pode ser interrompido ou limitado, levando ao acúmulo de aminas que ao entrar na corrente sanguínea provocam uma intoxicação (Shalaby, 1996; Silla-Santos, 1996).

2.2.4. Aminas bioativas em carcaças de frangos de corte

A superfície da carcaça de frangos de corte e da carne oferece condições adequadas especialmente para o desenvolvimento de micro-organismos e, conseqüentemente, para a produção de aminas bioativas. Sendo assim, a determinação da microbiota da

superfície da carcaça de frangos com foco na produção de aminas bioativas pode contribuir para a melhoria da qualidade e da inocuidade da carne de frango consumida (Tamim e Doerr, 2003; Min et al., 2004; Min et al., 2007; Moreira et al., 2008). Micro-organismos pertencentes à família das Enterobacteriaceae, Micrococcaceae, e gêneros como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* assim como bactérias ácido-láticas representam a microbiota mais comum no frango resfriado (del Rio et al., 2007; Nychas et al., 2008). Representantes destes micro-organismos são frequentemente considerados produtores de aminas bioativas (Geomaras et al., 1995; Bover-Cid et al., 2003; Pircher et al., 2007; Ozogul e Ozogul, 2007).

Buňkova et al. (2010) avaliaram a produção de aminas (histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, agmatina, espermidina e espermina) por micro-organismos isolados da microbiota natural do frango. Os micro-organismos isolados foram inoculados em meio de descarboxilação contendo precursores próprios de aminas bioativas (lisina, histidina, tirosina, ornitina, arginina) na concentração de 3,0 g/L. Dos 88 micro-organismos isolados da pele de frango, 41 foram identificados como sendo da família Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Pantoea* sp., *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *Serratia* sp., *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella* sp., *Leclercia adecarboxylata*, *Yersinia enterocolitica*), além de *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Delftia acidovorans*,

Moraxella sp., bastonetes Gram-negativo aeróbios, não fermentativos, oxidase positivos e bastonetes anaeróbios facultativos Gram-negativo inespecíficos fermentativos e oxidase negativos. A produção *in vitro* de pelo menos uma amina bioativa foi comprovada em 45 das 88 amostras de isolados. Putrescina e cadaverina foram as mais encontradas. Histamina, espermina e espermidina não foram encontradas. Enterobactérias foram consideradas as maiores produtoras de aminas, devido à presença de tiramina, agmatina, putrescina e cadaverina no meio após a incubação. Vinte e uma linhagens pertencentes à família Enterobacteriaceae e onze do gênero *Aeromonas*, foram capazes de produzir putrescina. Em relação à cadaverina, mais de 37,5% de todas as amostras testadas apresentaram esta amina. Com exceção do gênero *Pantoea*, todos os micro-organismos da família das Enterobacteriaceae produziram cadaverina. A maior produção se deu pelo gênero *Klebsiella* (127,43 a 140,00 mg/L de caldo). Também houve produção de cadaverina pelo gênero *Aeromonas*, porém, o valor máximo produzido foi menor ($73,84 \pm 6,69$ mg/L de caldo). Tiramina foi produzida *in vitro* por três linhagens de *Pantoea* sp. (2,02 a 2,52 mg/L de caldo) e uma de *P. vulgaris* (4,58 mg/L de caldo). Agmatina foi produzida apenas por três isolados de *E. coli* e um de *P. vulgaris*.

Nassar e Emam (2002) pesquisaram as aminas histamina, tiramina, cadaverina e putrescina em produtos à base de frangos (salsichas de frango e lanche) e correlacionaram suas concentrações com a qualidade microbiológica, pH e teor de

NaCl desses produtos. Segundo esses autores, 45% das amostras de salsicha foram positivas para histamina, 20% para tiramina, 75% para cadaverina e 80% para putrescina. Os valores médios encontrados foram de 4,50 mg/100g, 8,15 mg/100g, 3,14 mg/100g e 15,59 mg/100g, respectivamente. Das amostras de lanche, 50% foram positivas para histamina, 40% para tiramina, 50% para cadaverina e 55% para putrescina. Os valores médios encontrados foram de 2,30 mg/100g, 7,95 mg/100g, 3,71 mg/100g e 18,15 mg/100g, respectivamente. Segundo os autores, os teores de histamina e cadaverina encontrados foram considerados baixos e esses resultados foram correlacionados com a pequena contagem de micro-organismos das famílias Enterobacteriaceae e Lactobacillaceae, bem como o baixo valor de pH encontrados.

Silva e Glória (2002) determinaram os níveis das aminas bioativas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina em carne de peito e coxa de frango. As amostras foram analisadas imediatamente após o abate e com quatro, 10 e 15 dias de armazenamento a 4,0 °C. Nas amostras de carne de peito de frango, as aminas putrescina, cadaverina, histamina e tiramina, foram detectadas apenas no último dia de armazenamento, nas concentrações médias de 2,04 mg/100g, 0,43 mg/100g, 1,03 mg/100g e 1,74 mg/100g, respectivamente. As aminas espermidina e espermina foram detectadas durante todo o período de armazenamento em concentrações que variaram, do primeiro ao 15º dia, de 0,73

a 0,87 mg/100g para espermidina e 1,79 a 1,12 mg/100g para a espermina. Nas amostras de coxa, a putrescina foi detectada a partir do 10º dia de armazenamento, na concentração de 0,05 mg/100g e no 15º dia, o teor observado foi de 0,38 mg/100g. A cadaverina, assim como nas amostras de peito, foi detectada somente no 15º dia, na concentração de 0,13 mg/100g. Espermidina, espermina e histamina, foram encontradas, imediatamente após o abate, nas concentrações de 0,72 mg/100g, 1,62 mg/100g e 0,07 mg/100g, e no 15º dia de armazenamento as concentrações observadas foram de 0,64 mg/100g, 0,89 mg/100g e 0,54 mg/100g, respectivamente. A tiramina foi detectada no quarto e no 15º dia de armazenamento, nas concentrações de 0,21 e 0,14 mg/100g. Os autores concluíram que os níveis de aminas bioativas encontrados não representariam qualquer prejuízo, uma vez que o frango resfriado tem prazo de validade curto e os teores totais mais elevados foram detectados somente no 15º dia de armazenamento.

Patsias et al. (2006) avaliaram a presença de aminas bioativas (agmatina, feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermina, espermidina e triptamina) e sua correlação com a microbiota e características sensoriais de filés de peito de frango pré-prontos, embalados em condições aeróbicas ou em atmosfera modificada (30% CO₂ e 70% N₂) e armazenados por até 23 dias. As concentrações médias iniciais de putrescina e cadaverina, em amostras embaladas em condições aeróbicas,

foram de 0,08 mg/100g para putrescina e 0,02 mg/100g para a cadaverina e no 23º dia de armazenamento, os teores destas aminas aumentaram significativamente, atingindo concentrações de 20,26 mg/100g de putrescina e 1,48 mg/100g de cadaverina. Em amostras embaladas em atmosfera modificada, os valores iniciais de putrescina observados foram de 0,05 mg/100g e de cadaverina, 0,11 mg/100g, atingindo, no último dia de armazenamento, as concentrações de 9,04 mg/100g e 2,18 mg/100g para putrescina e cadaverina, respectivamente. A tiramina foi formada em ambas as formas de armazenamento e apresentou as concentrações iniciais de 0,03 e 0,01 mg/100g, chegando a valores finais de 1,88 mg/100g e 0,88 mg/100g para as amostras embaladas em condições aeróbicas e sob atmosfera modificada aos 23 dias de armazenamento, respectivamente. A concentração de histamina atingiu, no 23º dia de armazenamento, valores de 2,51 mg/100g nas amostras embaladas sob condições aeróbicas e de 3,75 mg/100g nas amostras embaladas sob atmosfera modificada. O teor de espermidina encontrado no último dia de armazenamento foi muito superior nas amostras embaladas sob atmosfera modificada, atingindo a concentração de 20,4 mg/100g, enquanto nas amostras embaladas em condições aeróbicas a concentração final atingida foi de 6,67 mg/100g. A agmatina, β-feniletilamina e triptamina não foram detectadas. A contagem padrão em placas atingiu 6,5 log UFC/g no oitavo (amostras embaladas em condições aeróbicas) e no 12º dia (amostras embaladas sob atmosfera modificada). Foi observado

também que, no oitavo dia, nas amostras embaladas em condições aeróbicas, os teores de putrescina atingiram 1,4 mg/100g e os de tiramina, 0,14 mg/100g e, nas amostras embaladas sob atmosfera modificada, concentrações de putrescina de 1,9 mg/100g e de tiramina de 0,14 mg/100g só foram observadas após 12 dias, levando os autores a concluir que a deterioração tem início mais cedo nas amostras embaladas em condições aeróbicas e que tanto os teores de putrescina (1,4-1,9 mg/100g) quanto os de tiramina (0,14 mg/100g) podem ser utilizados como indicativos do início do processo de deterioração em filés de peito de frango pré-prontos.

Balamatsia et al. (2006) pesquisaram putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermina e espermidina em carne de peito de frango armazenada por zero, cinco, oito, 11, 14 e 17 dias em temperatura de refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), e observaram que a putrescina foi a amina mais prevalente, seguida da cadaverina. Também foi possível verificar que, com exceção da espermina e espermidina, todas as aminas tiveram um aumento em suas concentrações do dia zero ao dia 17. A putrescina foi encontrada na concentração de 4,8 mg/100g no dia zero e chegou a 35,4 mg/100g no 17º dia. Da mesma forma, a cadaverina foi encontrada em uma concentração de 0,85 mg/100g no dia zero chegando até 22,37 mg/100g no dia 17. A histamina foi detectada à partir do dia 11, na concentração de 0,54 mg/100g, e no dia 17, na concentração de 1,92 mg/100g. A concentração de espermina decresceu, iniciando-se com 5,33 mg/100g no dia zero e terminando

com 3,66 mg/100g aos 17 dias de armazenamento. O mesmo aconteceu com o teor de espermidina, que no início do período de armazenamento era de 0,79 mg/100g e chegou a 0,48 mg/100g no final. Esta redução das aminas espermina e espermidina não foi explicada pelos autores, e segundo os mesmos, as diferenças de valores das aminas encontradas em relação aos diversos trabalhos disponíveis na literatura pode se dar em função da diferente microbiota encontrada, assim como por suas contagens observadas. Os autores também sugeriram que as aminas espermina e espermidina não podem ser utilizadas como padrão de indicação de frescor e qualidade da carne de frango.

Moreira et al. (2008) investigaram a influência da maturação de carne de peito de frango, nas temperaturas de 1 a 5,7 °C por oito horas, e o efeito do congelamento ($-18 \pm 1^{\circ}\text{C}$) por até 89 dias, sobre os níveis de aminas bioativas neste produto. Os teores de aminas bioativas em amostras maturadas foram significativamente maiores quando comparados a amostras não maturadas. A concentração média encontrada de espermina em amostras não maturadas foi de 2,95 mg/100g, enquanto que nas amostras maturadas, o teor encontrado foi de 3,87 mg/100g. A espermidina apresentou concentrações de 0,627 mg/100g e 2,74 mg/100 para amostras não maturadas e maturadas, respectivamente. Os teores de putrescina encontrados foram de 0,043 mg/100g em amostras não maturadas e de 0,1 mg/100g em amostras maturadas. A tiramina só foi detectada em amostras maturadas, na concentração média de

0,095 mg/100g. Foi observada uma correlação significativa entre a temperatura de maturação e os níveis totais de amins bioativas. A maturação em temperaturas acima de 4,9 °C induziu a formação de histamina, levando os autores a concluir que, a maturação deve ser realizada em temperaturas abaixo de 4,9 °C para evitar a formação desta amina. Durante o armazenamento da carne de peito de frango a -18 ± 1 °C por 89 dias, houve uma queda significativa nos teores de espermina, espermidina, putrescina e tiramina. A concentração de espermina nessas amostras passou de 3,87 mg/100g no início do período de armazenamento para 0,742 mg/100g no final do período de 89 dias. A espermidina teve sua concentração inicial de 2,74 mg/100g reduzida para 0,802 mg/100g. O teor de putrescina encontrado aos 89 dias de armazenamento foi de 0,018 mg/100g. A tiramina só foi detectada aos 64 dias de armazenamento. A histamina foi encontrada apenas aos 89 dias de armazenamento (0,047 mg/100g,) nas amostras congeladas (-18 ± 1 °C), levando os autores a concluir que a histamina poderia ser utilizada como um índice de qualidade, pois só foi detectada nestas amostras no último dia de armazenamento e nos peitos de frango que foram maturados em temperaturas acima de 4,9 °C.

Kozová et al. (2009) avaliaram os níveis de putrescina, espermidina e espermina em 20 carcaças de frango analisadas 24 horas após o abate, das quais foram retiradas amostras de peito, coxa, pele, fígado e coração para análise. Os maiores valores de espermidina foram

encontrados nas amostras de fígado (4,87 mg/100g) e os menores, nas amostras de carne de peito de frango (0,48 mg/100g). Os valores de espermina foram de 3,68 mg/100g, 3,80 mg/100g, 2,43 mg/100g, 13,3 mg/100g e 8,27 mg/100g em amostras de peito, coxa, pele, fígado e coração, respectivamente. A putrescina foi detectada em algumas amostras, porém em concentrações próximas ao limite de detecção do método de 0,1 mg/100g. Os autores concluíram que tanto os miúdos, quanto a carne de frango fresca, são fontes importantes de poliaminas na dieta, principalmente de espermina.

Baston et al. (2010) avaliaram a qualidade de cortes de frangos, armazenados sob refrigeração (4,0 °C) por até sete dias, utilizando a contagem de micro-organismos psicrotróficos, contagem padrão em placas e os níveis de amins bioativas (histamina, putrescina, cadaverina, espermina e espermidina). Foram analisadas carne de peito (carne branca) e carne de coxa/sobrecoxa (carne vermelha). As amostras foram analisadas um dia após o abate (dia 1), e em seguida no terceiro, quinto e sétimo dias (dias 3, 5 e 7). A concentração inicial de histamina foi muito pequena, ou seja, inferior a 0,2 mg/100g, tanto nas amostras de carne de peito quanto nas de carne de coxa, porém no último dia de armazenamento, o teor desta amina foi maior na carne de peito do que na carne de coxa, mas continuou baixo, não ultrapassando 0,3 mg/100g. A putrescina só foi detectada a partir do terceiro dia, porém, em pequena quantidade e somente na carne da coxa (carne vermelha), atingindo a

concentração de 1,05 mg/100g no último dia de armazenamento. A cadaverina foi detectada a partir quinto dia de armazenamento, na concentração de aproximadamente 0,2 mg/100g, tanto na carne vermelha quanto na carne do peito (carne branca), porém, no último dia de armazenamento o teor de cadaverina foi maior na carne vermelha, apresentando um valor próximo a 0,8 mg/100g. Foi encontrado um teor inicial alto de espermina (2,2 mg/100g para carne branca e 1,8 mg/100g para carne vermelha), que diminuiu lentamente até ao sétimo dia de armazenamento (2,0 mg/100g de carne branca e 1,7 mg/100g de carne vermelha), devido provavelmente, à utilização de espermina como fonte de nitrogênio para os micro-organismos. No caso da espermidina, foi encontrada uma quantidade relativamente pequena (cerca de 0,5 mg/100g para carne branca e 0,65 mg/100g para carne vermelha). Os autores observaram que a carne vermelha tem uma maior carga microbiana e níveis mais altos de cadaverina e de putrescina, o que pode indicar uma maior contaminação nas operações de corte da carne vermelha quando comparada à carne branca.

Gallas et al. (2010) estudaram o efeito da utilização de embalagens com atmosfera modificada sobre o crescimento de micro-organismos e os níveis de aminas bioativas em peitos de frango. As amostras foram embaladas sob dois tipos de atmosfera modificada (A: 75% de O₂ de 25% de CO₂ e B: 75% de N₂ e 25% de CO₂) e armazenadas durante 14 dias em temperatura refrigeração (2 a 4°C). Foram realizadas avaliações no dia da

embalagem (considerado como dia zero) e após três, nove e 14 dias de estocagem. As aminas putrescina e cadaverina só foram detectadas a partir do 9º dia e atingiram, no 14º dia de armazenamento, as concentrações de 2,98 mg/100g e 0,95 mg/100g respectivamente, quando embaladas com a atmosfera modificada tipo A. Na atmosfera modificada B, os teores encontrados destas aminas foram maiores, chegando a 6,06 mg/100g para a putrescina e 4,24 mg/100g para a cadaverina. Histamina e tiramina só foram detectadas a partir do 9º dia de armazenamento na atmosfera modificada B e, ao final do período as concentrações verificadas foram de 0,16 mg/100g para a histamina e 0,32 mg/100g para a tiramina. As concentrações de espermina, observadas no dia 0, foram de 1,78 mg/100g (atmosfera modificada A) e 1,77 mg/100g (atmosfera modificada B) e as concentrações iniciais de espermidina observadas foram de 0,75 mg/100g (atmosfera modificada A) e 0,76 mg/100g (atmosfera modificada B). Segundo estes autores, os melhores resultados foram obtidos com a utilização da atmosfera modificada A e o maior teor de aminas bioativas encontrado na atmosfera modificada B, pode ser explicado devido à maior contagem de coliformes obtida nessas amostras quando comparada à atmosfera modificada A.

Lázaro et al. (2013) estudaram a influência da utilização de dois tipos de embalagem de peitos de frango congelados (bandeja de poliestireno expandido e sacos de polietileno de baixa densidade) sobre os níveis de aminas bioativas. A média dos teores de

putrescina encontrados foi de 0,69 mg/100g nas amostras embaladas em bandejas de poliestireno e de 0,67 mg/100g nas amostras embaladas em sacos de polietileno. Para cadaverina os valores foram de 0,47 e 0,45 mg/100g em peitos de frango embalados em bandejas e em sacos, respectivamente. Espermidina foi encontrada na concentração de 0,98 mg/100g nas amostras embaladas em bandejas e de 1,07 mg/100g nas amostras embaladas em sacos de polietileno. A concentração de espermina observada nas amostras embaladas em bandejas de poliestireno foi de 1,60 mg/100g e nas amostras embaladas em sacos, 1,89 mg/100g. Não foi observada diferença entre os dois tipos de embalagem para as aminas putrescina, cadaverina, espermidina e espermina, porém a concentração de tiramina foi maior ($P < 0,05$) em peitos de frango embalados em bandejas (23,07 mg/100g).

2.2.5. Aminas bioativas em ovos

Alguns trabalhos avaliando a presença de aminas em ovos são descritos na literatura. Em um estudo realizado por Moudgal et al. (1991) foi observada a presença de histamina (0,0765 mg/100g) na gema de ovos frescos e segundo estes autores, poedeiras com maior índice de postura apresentavam concentração superior de histamina nas gemas que poedeiras com menor índice de postura. Apesar da redução da concentração de histamina durante o armazenamento sob refrigeração a 10°C por cinco dias e também após o aquecimento a 41°C por 30 ou 60 minutos, esta amina ainda foi detectada após o cozimento dos ovos.

Saito et al. (1992) avaliaram ovos deteriorados quanto ao teor de aminas biogênicas e encontraram 1,52 mg/100g de putrescina e 5,52 mg/100g de cadaverina. Histamina, tiramina, espermidina e espermina não foram detectadas.

Bardócz et al. (1995) observaram em ovos cozidos uma variação de 0,026 a 0,035; 0 a 0,015 e 0,02 a 0,06 mg/100g de putrescina, espermidina e espermina, respectivamente.

Okamoto et al. (1997) ao trabalharem com ovos em casca e cozidos encontraram baixos teores de poliaminas. Os valores encontrados foram inferiores a 0,04 mg/100g de putrescina, 0,1 mg/100g de espermina, 0,05 mg/100g de cadaverina, 0,05 mg/100g de histamina e 0,14 mg/100g de espermidina.

Segundo Glória (2005), a presença de putrescina e agmatina ao longo do armazenamento pode representar o aparecimento de deterioração, uma vez que estas são aminas biogênicas, produzidas pela descarboxilação de ornitina e arginina, respectivamente.

Lima et al. (2006) avaliaram a presença de putrescina, espermina e espermidina em ovos crus comercializados em supermercados e após o cozimento, e observaram quantidades semelhantes de espermidina e espermina no albúmen e na gema destes ovos. Os autores verificaram que a gema crua possuía, em média, 0,032 mg/100g de espermidina e 0,076 mg/100g de espermina enquanto no albúmen foram encontradas médias de 0,054 mg/100g de espermidina e

0,093 mg/100g de espermina. Apesar de uma aparente diminuição dos teores de espermidina (0,038 mg/100g) e de espermina (0,049 mg/100g) no albúmen após o cozimento, e um aumento dessas aminas na gema para 0,044 mg/100g de espermidina e 0,104 mg/100g de espermina, o processo de cozimento não alterou significativamente o teor dessas poliaminas. Foi detectado apenas traços de putrescina nos ovos analisados. As concentrações das duas aminas observadas nos ovos foram menores que as encontradas em outros alimentos analisados, como batata, arroz, feijão, tomate, laranja, cebola e alho.

Ao pesquisar o conteúdo de poliaminas em diversos alimentos e bebidas comercializados no Japão, Nishimura et al. (2006) observaram que em ovos, a cadaverina estava presente no albúmen, na concentração de 0,02 mg/100g, e, na gema, além da cadaverina (2,66 mg/100g), estavam presentes a putrescina (0,088 mg/100g) e a espermidina (0,058 mg/100g).

Oliveira et al. (2009) investigaram a possibilidade de utilizar o teor de aminas bioativas como um índice de qualidade de ovos frescos e armazenados. Os ovos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: no primeiro grupo, foram analisados ovos frescos (ovos postos no dia das análises), no segundo grupo, ovos armazenados a 25 °C por 30 dias (analisados a cada cinco dias de armazenamento) e no terceiro grupo, ovos armazenados a 6 °C por 50 dias (analisados a cada 10 dias de armazenamento). Foram avaliados os teores das aminas espermina,

espermidina, putrescina, cadaverina, histamina, serotonina, agmatina, feniletilamina, triptamina e tiramina, no albúmen e na gema dos ovos. Nenhuma das dez aminas pesquisadas foi detectada no albúmen, no entanto, na gema foram identificadas as aminas espermidina, espermina, agmatina e putrescina. Os níveis de espermidina aumentaram durante o armazenamento em ambas as temperaturas, chegando a uma concentração máxima aos 15 (1,35 mg/kg) e 40 dias (1,77 mg/kg), quando os ovos foram armazenados a 25°C e a 6°C, respectivamente. As aminas putrescina e agmatina foram detectadas apenas quando foi encontrada a concentração máxima de espermidina. A espermina só foi detectada no 30º dia de armazenamento a 25°C. Os autores concluíram que ovos contendo teores totais de aminas superiores a 0,1 mg/100g na gema, poderiam ser considerados ovos de baixa qualidade e que, baseado na presença de aminas biogênicas (agmatina e putrescina), a vida de prateleira dos mesmos seria de 15 e 40 dias em temperatura ambiente e sob refrigeração, respectivamente.

Ramos et al. (2009) pesquisaram putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina, propilamina, etilamina, etanolamina, espermina e espermidina na gema de ovos armazenados durante 26 dias em temperaturas de 5 e 25°C. Foi observada a presença de putrescina, cadaverina, propilamina, etilamina e etanolamina nas amostras analisadas, sendo que a temperatura de armazenamento dos ovos não influenciou os níveis dessas aminas. Durante o período de armazenamento

houve diminuição da concentração dessas cinco aminas detectadas na gema e segundo os autores, isso pode ter ocorrido devido ao aumento de peso da gema decorrente da passagem de água do albúmen para a gema durante o armazenamento e da migração dessas aminas para o albúmen, além de outras modificações químicas.

Figueiredo (2012) avaliou os efeitos da aplicação de óleo mineral sobre a casca e da utilização de embalagem plástica sobre os níveis de aminas bioativas na gema e albúmen de ovos, armazenados por até 125 dias sob refrigeração. Nas gemas dos ovos, foi observada uma redução nos valores de putrescina, que passou de 0,165 mg/100g no início do período de armazenamento para 0,103 mg/100g aos 125 dias. A cadaverina apresentou a concentração média mais alta (0,327 mg/100g), aos 55 dias de armazenamento. A espermidina apresentou baixas concentrações ao longo do período de armazenamento, e teve sua concentração reduzida de 0,074 mg/100g no início para 0,02 mg/100g no final do período. A concentração média encontrada de espermina no início do período de armazenamento foi de 0,052 mg/100g e esta amina não foi mais detectada a partir dos 83 dias de armazenamento. A histamina e a tiramina também foram detectadas na gema, porém em concentrações abaixo do limite de quantificação do método de 0,07 e 0,08 mg/100g, respectivamente. No albúmen, a concentração inicial de putrescina encontrada foi de 0,161 mg/100g e no final do período de armazenamento, foi de 0,141 mg/100g. Os teores de cadaverina também

diminuíram ao longo do período de 125 dias, passando de 0,210 mg/100g para 0,171 mg/100g. A concentração de feniletilamina no primeiro dia de armazenamento foi de 0,161 mg/100g e aos 125 dias, foi de 0,112 mg/100g. No albúmen, foram detectadas histamina, tiramina, espermidina e espermina, porém em concentrações abaixo do limite de quantificação. Segundo o autor, não foi possível estabelecer um critério de qualidade de ovos baseado na presença de aminas bioativas na gema e albúmen de ovos.

Figueiredo et al. (2013), com o objetivo de avaliar a qualidade interna de ovos de poedeiras de diferentes idades (30 e 60 semanas), analisaram 600 ovos armazenados sob refrigeração ($4,0 \pm 1$ °C) e em temperatura ambiente ($25,0 \pm 1$ °C) durante 28 dias. Foram pesquisadas na gema e no albúmen dos ovos agmatina, feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, serotonina, tiramina, triptamina, espermidina e espermina. Em todas as amostras analisadas, foram detectadas apenas feniletilamina no albúmen e espermidina na gema. Os teores médios de feniletilamina encontrados no albúmen dos ovos de poedeiras com 30 semanas de idade, armazenados em temperatura ambiente foram de 2,95 mg/100g, em ovos analisados um dia após a postura, e 4,70 mg/100g nos ovos analisados após 28 dias de estocagem, enquanto nos ovos mantidos a 4°C, a concentração final encontrada aos 28 dias foi de 3,65 mg/100g. Nos ovos de poedeiras com 60 semanas de idade, os teores desta amina encontrados foram menores, variando de 2,55 mg/100g a 3,90 mg/100g em ovos

armazenados em temperatura ambiente e de 1,99 mg/100g a 2,94 mg/100g em ovos refrigerados. A refrigeração auxiliou na manutenção dos valores de feniletilamina em níveis mais baixos. A espermidina só pôde ser detectada nas gemas a partir do 21º dia de armazenamento e o teor encontrado aos 28 dias foi de 0,102 mg/100g. Segundo os autores, a feniletilamina foi detectada em todas as amostras de albúmen analisadas, independentemente da idade da poedeira e da temperatura de armazenamento dos ovos, e, em algumas amostras, os teores encontrados foram superiores ao nível considerado tóxico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A presença de aminas bioativas foi pesquisada na carne de peito de frangos de corte e no albúmen e gema dos ovos produzidos no estado de Minas Gerais. As amostras de ovos de consumo e de carcaças de frangos (resfriadas e congeladas) foram coletadas diretamente das indústrias pelas coordenadorias regionais do Serviço de Inspeção Estadual (SIE) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e coordenadorias regionais do Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizadas no estado de Minas Gerais. As amostras de carcaças de frangos, que foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo reciclável, e as amostras de ovos, coletadas e mantidas em temperatura ambiente, foram enviadas ao Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos (LSMA) do IMA, onde foi realizado o

procedimento de extração das aminas, e, posteriormente, encaminhadas ao Laboratório de Imunologia Aplicada da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) para análise cromatográfica.

3.2. Método de determinação de aminas bioativas

As aminas bioativas presentes no conteúdo interno de ovos de consumo (feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina) e na carne de peito de frango (putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina) foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por pareamento de íons em coluna de fase reversa e quantificadas por detecção ultravioleta (UV) após derivação pré-coluna com cloreto de dansila.

O método analítico por CLAE-UV para determinação e quantificação de aminas bioativas em gema e albúmen de ovos utilizado foi validado por Figueiredo (2012) e a metodologia analítica por CLAE-UV para determinação e quantificação de aminas bioativas em carne de peito de frango foi validada neste trabalho.

As etapas de derivação e as condições cromatográficas utilizadas na validação do método para pesquisa de aminas bioativas na carne de peito de frango foram adaptadas das metodologias descritas por Malle e Valle (1996), Duflos et al. (1999) e Brasil (2011), utilizadas para determinação de aminas em pescado.

3.3. Reagentes e padrões

Para as análises das amostras de ovos, foram empregados os padrões de aminas da marca Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA): dicloridrato de putrescina, dicloridrato de cadaverina, cloridrato de tiramina, dicloridrato de histamina, tricloridrato de espermidina, tetracloridrato de espermina e cloridrato de 2-feniletilamina. Para as análises das amostras de frango, foram utilizados os mesmos padrões, com exceção do cloridrato de 2-feniletilamina, pois a pesquisa dessa amina não foi realizada nessa matriz. O cloreto de dansila que foi utilizado como agente derivador, o ácido tricloroacético (TCA) e a L-prolina puro para análise (PA) também foram adquiridos da marca Sigma. A acetona, ácido clorídrico e o tolueno, ambos de grau cromatográfico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura utilizada na realização das análises foi obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

3.4. Preparo dos reagentes e padrões

Foram preparadas, inicialmente, soluções estoque dos padrões das aminas através da diluição do padrão de cada amina separadamente em água ultrapura, formando soluções padrão contendo 1 mg/mL de cada amina. Para o processo de validação na matriz frango, 1 mL de cada solução padrão foi transferido para um balão volumétrico, formando uma solução contendo as seis aminas juntas (putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina),

resultando na concentração final de 166 µg/mL.

A solução de cloreto de dansila foi preparada na concentração de 7,5 mg/mL de acetona e armazenada a -20 °C, enquanto a solução de L-prolina foi preparada na concentração de 100 mg/mL de água destilada e armazenada sob refrigeração.

3.5. Validação do método analítico por CLAE-UV para quantificação de aminas bioativas em carne de peito de frango

3.5.1. Preparo das amostras

Para realização do procedimento de extração, foram coletados aproximadamente 10g de carne de peito de frango que foram triturados utilizando um mixer (Arno S.A. Indústria e Comércio, São Paulo, Brasil). Após a trituração foram pesados 5 g da amostra em tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL, aos quais foram adicionados 7 mL de TCA a 5%. Os tubos foram agitados por 10 minutos em mesa agitadora TE1401 Tecnal a 200 RPM (Tecnal, São Paulo, Brasil), e depois centrifugados a 6.000 RPM (5.232 \times g) a 4°C por 25 minutos em centrífuga refrigerada Cientec CT 6000R (Cientec, São Paulo, Brasil). Após a primeira etapa de centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes com adições de sete e seis mililitros de TCA 5%, totalizando 20 mL de ácido adicionado. Os extratos obtidos foram armazenados em microtubos de 0,5 mL e congelados a -20°C para

posterior realização do processo de derivação e análise cromatográfica.

Para o processo de derivação, 200 µL do extrato foram transferidos para tubos de centrífuga de polipropileno e ao extrato foram adicionados 400 µL de solução saturada de bicarbonato de sódio e 800 µL de solução de cloreto de dansila (C₁₂H₁₂ClNO₂S). A solução foi agitada em *vortex* por aproximadamente 30 segundos e deixada ao abrigo da luz em banho de água quente a 60 °C por cinco minutos. Após essa etapa, adicionaram-se 200 µL de solução de L-Prolina, agitou-se novamente em *vortex* por 30 segundos e a solução foi armazenada ao abrigo da luz à temperatura ambiente por 30 minutos.

Decorrido esse tempo, foram adicionados 1.000 µL de tolueno e agitado em *vortex* por um minuto para posterior centrifugação a 4.350 *xg* por 10 minutos à temperatura de 4 °C, para a separação das fases. A fase orgânica (sobrenadante) foi recuperada com auxílio de um pipetador automático para um tubo de ensaio de 5 mL e levada ao concentrador de amostras para evaporação por adição de fluxo de nitrogênio por aproximadamente 10 minutos a uma temperatura de aproximadamente 60 °C.

O extrato obtido foi dissolvido com 600 µL de acetonitrila grau UV/CLAE (Merck, Darmstadt, Alemanha) e filtrado com unidade filtrante com membrana de PTFE, poro 0,45 µm e diâmetro de 13 a 15 mm (Millipore Corp, Milford, MA, EUA), sendo o filtrado reservado para injeção.

3.5.2. Condições Cromatográficas

Para a realização das análises cromatográficas foi utilizado o cromatógrafo ÄKTAmicro™ (GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra), equipado com duas bombas modelo P-900, injetor manual modelo INV-907 com *loop* de 100 µL, detector UV visível (UV-900) e o *software* Unicorn 5.11 (GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra) para o processamento de dados. Os cromatogramas foram processados no comprimento de onda de 254 nm. Para a separação das aminas foi utilizada uma coluna cromatográfica Kromasil C₁₈ (5µm, 100 Angstrom, 25 cm x 4.6 mm) (AkzonNobel, Amsterdam, Holanda) e as fases móveis água e acetonitrila, em um fluxo de 1,0 mL/min, conforme o gradiente de eluição apresentado na Tab. 3.

Tabela 3. Gradiente de eluição das fases móveis água e acetonitrila utilizadas na determinação de aminas em carne de peito de frango

Tempo em minutos	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	100	0
8,45	100	0
8,46	40	60
15,00	25	75
17,23	25	75
23,39	5	95
30,58	5	95
30,59	0	100

3.5.3. Procedimentos de Validação

Para realizar o processo de validação foram avaliadas as seguintes características de desempenho: linearidade, seletividade, precisão,

exatidão e limite de detecção e quantificação.

3.5.3.1. Linearidade

Para a avaliação da linearidade foram analisadas amostras de carne de peito de frango adicionadas de soluções padrão de aminas nas concentrações de 0,09; 0,29; 0,92; 2,95 e 9,44 mg/100g em sete repetições. Após as análises, foi construído um gráfico relacionando área do pico *versus* concentração e, por regressão linear, foram definidas as equações das curvas e os coeficientes de correlação e determinação (INMETRO, 2011).

3.5.3.2. Seletividade

A seletividade foi avaliada pela comparação dos tempos de retenção dos padrões de aminas adicionados no solvente (água) e na presença da matriz peito de frango.

3.5.3.3. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados a partir da equação que leva em consideração os parâmetros da curva analítica segundo ICH (2005).

$$LD = \frac{3 \times \sigma}{S} \quad LQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

Sendo:

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

σ = desvio padrão da resposta

S = inclinação da curva analítica

Para o cálculo dos desvios padrão utilizados nas equações para

determinação dos limites de detecção e quantificação foram utilizadas as respostas obtidas após as análises de amostras brancas, ou seja, sem a adição de solução padrão de aminas.

3.5.3.4. Precisão

A precisão das análises foi avaliada pela determinação do coeficiente de variação (CV) em condições de repetitividade, utilizando os resultados obtidos por análises sucessivas da mesma amostra, em curtos intervalos de tempo e efetuadas sob as mesmas condições (equipamentos e mesmo analista). Desse modo, às amostras do peito de frango foram adicionadas de solução padrão de aminas para realização de nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa (0,29 mg/100g), média (4,72 mg/100g) e alta (9,44 mg/100g), com três réplicas cada (ICH, 2005; ANVISA, 2003).

Os coeficientes de variação foram avaliados de acordo com parâmetros estabelecidos pela EC (2002) e Codex Alimentarius (2009), seguindo os valores descritos na Tab 2.

3.5.3.5. Exatidão

A exatidão foi avaliada através da realização de ensaios de recuperação, em que amostras de carne de peito de frango foram fortificadas com quantidades conhecidas do analito e os resultados foram comparados em relação às quantidades reais presentes na amostra. Foram realizadas nove determinações, contemplando o intervalo linear do

método, ou seja, três concentrações, baixa (0,29 mg/100g), média (4,72 mg/100g) e alta (9,44 mg/100g). A recuperação obtida em cada concentração foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

Em que:

C₁= Concentração do analito na amostra fortificada;

C₂= Concentração do analito na amostra não fortificada;

C₃= Concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

As recuperações nas diferentes concentrações analisadas foram comparadas ao intervalo de variação aceitável na faixa de concentração

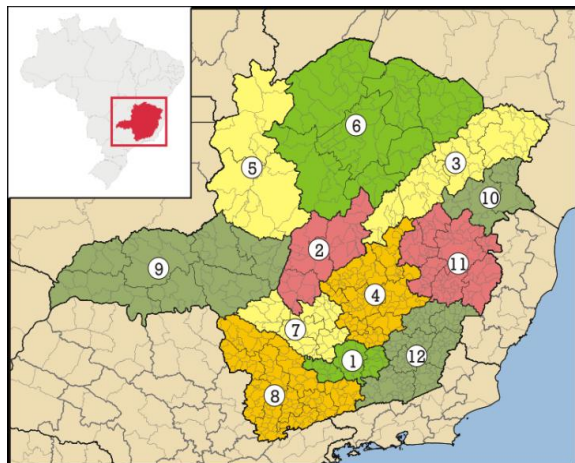
recomendada pela EC (2002) e pelo Codex Alimentarius (2009) (Tab. 2).

3.6. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE AMINAS BIOATIVAS EM AMOSTRAS DE CARNE DE PEITO DE FRANGO E OVOS DE CONSUMO

3.6.1. Aminas bioativas em amostras de carne de peito de frango

3.6.1.1. Estratificação geográfica do estado de Minas Gerais e amostragem

Para maior representatividade da amostragem do projeto, o estado de Minas Gerais foi dividido em doze mesorregiões, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) conforme ilustrado na Fig. 4.



Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki>

	Mesorregião	Micro região	Municípios
1	Campo das Vertentes	3	36
2	Central Mineira	3	30
3	Jequitinhonha	6	53
4	Metropolitana de Belo Horizonte	8	105
5	Noroeste de Minas	2	19
6	Norte de Minas	7	89
7	Oeste de Minas	5	44
8	Sul e Sudoeste de Minas	10	146
9	Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba	7	20
10	Vale do Mucuri	2	23
11	Vale do Rio Doce	7	99
12	Zona da Mata Mineira	7	142

Figura 4. Divisão de Minas Gerais em mesorregiões e suas respectivas microrregiões e municípios correlatos

Determinadas as mesorregiões, verificou-se em quais delas existiam estabelecimentos fiscalizados pelo SIF e

pelo SIE, através do levantamento de dados efetuados pelo MAPA e pelo IMA. Uma vez conhecidos os

estabelecimentos e suas localizações, os estabelecimentos foram numerados e sorteados aleatoriamente, por mesorregião e por sistema de inspeção. De acordo com a disponibilidade das indústrias por mesorregião em Minas

Gerais, foram então selecionados cinco estabelecimentos inspecionados pelo Sistema de Inspeção Federal (SIF) e cinco pelo Sistema de Inspeção Estadual (SIE) para coleta de carcaças de frango, conforme descrito na Tab. 6.

Tabela 6. Municípios dos estabelecimentos sorteados por mesorregião de Minas Gerais e por sistema de fiscalização para frango

Mesorregião	Sistema de Inspeção	
	Federal	Estadual
Campo das Vertentes	Barbacena	-
Metropolitana	Pará de Minas	Belo Horizonte
Oeste de Minas	São Sebastião do Oeste	Bambuí/Oliveira
Sul e Sudoeste	Passos	Passos
Triângulo Mineiro	Uberaba	Uberlândia

Para cada estabelecimento produtor de carne de frango foram realizadas quatro coletas durante o período de maio de 2010 a junho de 2011, totalizando as quatro estações do ano. Em cada estabelecimento e em cada coleta foram encaminhadas para análise quatro amostras de quatro lotes de produção (cada amostra foi considerada uma repetição), totalizando 160 amostras (quatro repetições x quatro estações x 10 estabelecimentos). De acordo com a característica de comercialização da indústria frigorífica, as carcaças de frango foram coletadas congeladas (96 carcaças provenientes de três indústrias sob inspeção federal e três indústrias sob inspeção estadual ou resfriadas (64 carcaças provenientes de duas indústrias sob inspeção federal e duas indústrias sob inspeção estadual).

As aminas bioativas pesquisadas em carne de peito de frango pelo método

validado neste trabalho foram: putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina.

3.6.2. Aminas bioativas no albúmen e gema de ovos de consumo

3.6.2.1. Estratificação geográfica do estado de Minas Gerais e amostragem

Para maior representatividade da amostragem, o estado de Minas Gerais também foi dividido em doze mesorregiões, de acordo com o IBGE (Fig. 4) e verificou-se em quais delas existiam estabelecimentos fiscalizados pelo SIF e pelo SIE, através do levantamento de dados efetuados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Uma vez conhecidos os estabelecimentos e suas localizações, os estabelecimentos foram numerados e sorteados

aleatoriamente, por mesorregião e por sistema de inspeção. De acordo com a disponibilidade das indústrias de ovos por mesorregião em Minas Gerais, foram então selecionados quatro

estabelecimentos submetidos a fiscalização pelo SIF e três pelo SIE para coleta de ovos, conforme descrito na Tab. 7.

Tabela 7. Municípios dos estabelecimentos sorteados por mesorregião de Minas Gerais e por sistema de fiscalização para ovos

Mesorregião	Sistema de Inspeção	
	Federal	Estadual
Campo das Vertentes	Nepomuceno	Lavras
Metropolitana	Pedro Leopoldo	-
Oeste de Minas	-	Divinópolis
Sul e Sudoeste	Passa Quatro	Boa Esperança
Triângulo Mineiro	Uberaba	-

Para cada estabelecimento produtor de ovo foram realizadas duas coletas de amostras durante o período de maio de 2010 a junho de 2011, sendo uma coleta no verão e outra no inverno (estação chuvosa e estação seca). Foram coletados 224 ovos provenientes de sete estabelecimentos distintos. Em cada coleta foram amostrados quatro ovos de cada quatro lotes de distintos de produção (quatro repetições composta por um *pool* de quatro ovos), totalizando 56 amostras de gema e 56 amostras de albúmen (quatro repetições x duas estações x sete estabelecimentos).

As aminas bioativas pesquisadas utilizando o método validado por Figueiredo (2012) foram: feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina.

3.6.3. Temperatura e pluviosidade das mesorregiões do estado de Minas Gerais avaliadas

Com o objetivo de avaliar a influência do clima de cada mesorregião sobre os teores de aminas bioativas encontrados nos produtos de origem avícola, foram coletados dados referentes às médias de precipitação pluviométrica (mm) e de temperaturas máximas e mínimas (°C) por estação do ano e por mesorregião do estado de Minas Gerais. Os dados compreendem o período entre maio de 2010 e junho de 2011, em que foram realizadas as coletas das amostras.

Os dados de precipitação pluviométrica das mesorregiões por estação durante os anos de 2010 e 2011 são apresentados na Tab. 4.

Tabela 4. Precipitação pluviométrica (mm) por estação do ano e por mesorregião do estado de Minas Gerais durante os anos de 2010 e 2011

Mesorregião	Estações do ano (média de precipitação – 2010/2011)			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Sul e Sudoeste	23,13	193,97	184,43	114,83
Campo das Vertentes	16,37	163,43	247,13	129,77
Oeste de Minas	7,37	175,37	199,97	173,00
Metropolitana	4,87	228,07	225,90	146,07
Triângulo Mineiro	8,60	205,13	233,03	310,37
Média	12,07	193,19	218,09	174,81

Fonte: Adaptado de Brasil, 2013.

É possível observar que o inverno apresentou menor precipitação pluviométrica e o verão foi a estação que teve maiores médias de precipitação.

Os dados de temperaturas máximas e mínimas das mesorregiões por estação do ano durante os anos de 2010 e 2011 são apresentados na Tab. 5.

Tabela 5. Temperaturas máximas e mínimas por estação do ano e por mesorregião do estado de Minas Gerais, durante os anos de 2010 e 2011

Mesorregião	Estações do ano (média °C – 2010/2011)							
	Inverno		Primavera		Verão		Outono	
	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.
Sul e Sudoeste	25,07	14,70	25,17	14,27	28,03	17,50	25,07	14,70
Campo das Vertentes	25,20	11,80	27,43	15,90	29,87	19,00	26,97	16,40
Oeste de Minas	27,47	10,13	29,57	16,60	31,43	19,33	28,80	16,07
Metropolitana	25,50	15,20	27,60	17,63	29,47	20,03	26,90	18,43
Triângulo Mineiro	29,40	12,97	31,33	17,87	31,03	19,97	29,37	17,10

Fonte: Adaptado de Brasil, 2013.

3.7. Delineamento Experimental

O ensaio das análises de carne de peito de frango foram conduzidas no delineamento inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 10 x 4 (dez estabelecimentos x quatro estações) sendo quatro repetições por tratamento. Cada carcaça de frango, que teve a carne

de peito coletada, foi considerada uma repetição. As análises dos ovos foram conduzidas em um delineamento inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 7 x 2 (sete estabelecimentos x duas estações) sendo quatro repetições por tratamento. Cada repetição foi composta por um *pool* de quatro ovos.

Para a avaliação dos resultados foi realizada a transformação de dados e para aqueles que apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste de Student-Newman-Keuls. Para os resultados que não apresentaram distribuição normal e/ou homocedasticidade foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis em nível de significância de 5%, segundo Sampaio (2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Validação da metodologia para quantificação de aminas bioativas em carne de peito de frango

4.1.1. Linearidade

As curvas analíticas, o coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (R^2) das análises da matriz fortificada (carne de peito de frango adicionada de solução padrão das aminas), obtidas na avaliação da

linearidade na faixa de 0,09 a 9,44 mg/100g, estão representadas na Tab. 8 e na Fig. 5.

A partir dos valores obtidos, concluiu-se que o modelo foi adequado, pois o coeficiente de determinação foi maior que 0,99, considerado como evidência de um excelente ajuste dos dados para a linha de regressão.

Os valores dos coeficientes de correlação (r) apresentaram valores superiores a 0,99 que estão em conformidade com os critérios do INMETRO (2011) que recomendam valores maiores que 0,90 para os testes de linearidade. A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Ribani et al., 2007).

Tabela 8. Equações de regressão linear, coeficientes de determinação e de correlação das curvas analíticas para cada amina adicionada a matriz frango

Aminas	Equação	R^2	r
Putrescina	$y = 20,561x - 0,7888$	0,9988	0,9993
Cadaverina	$y = 19,064x + 10,763$	0,9990	0,9994
Histamina	$y = 16,885x - 0,3534$	0,9996	0,9998
Tiramina	$y = 14,244x + 5,2886$	0,9998	0,9993
Espermidina	$y = 18,598x + 6,1861$	0,9997	0,9998
Espermina	$y = 15,659x + 0,0536$	0,9997	0,9998

R^2 : coeficiente de determinação; r: coeficiente de correlação.

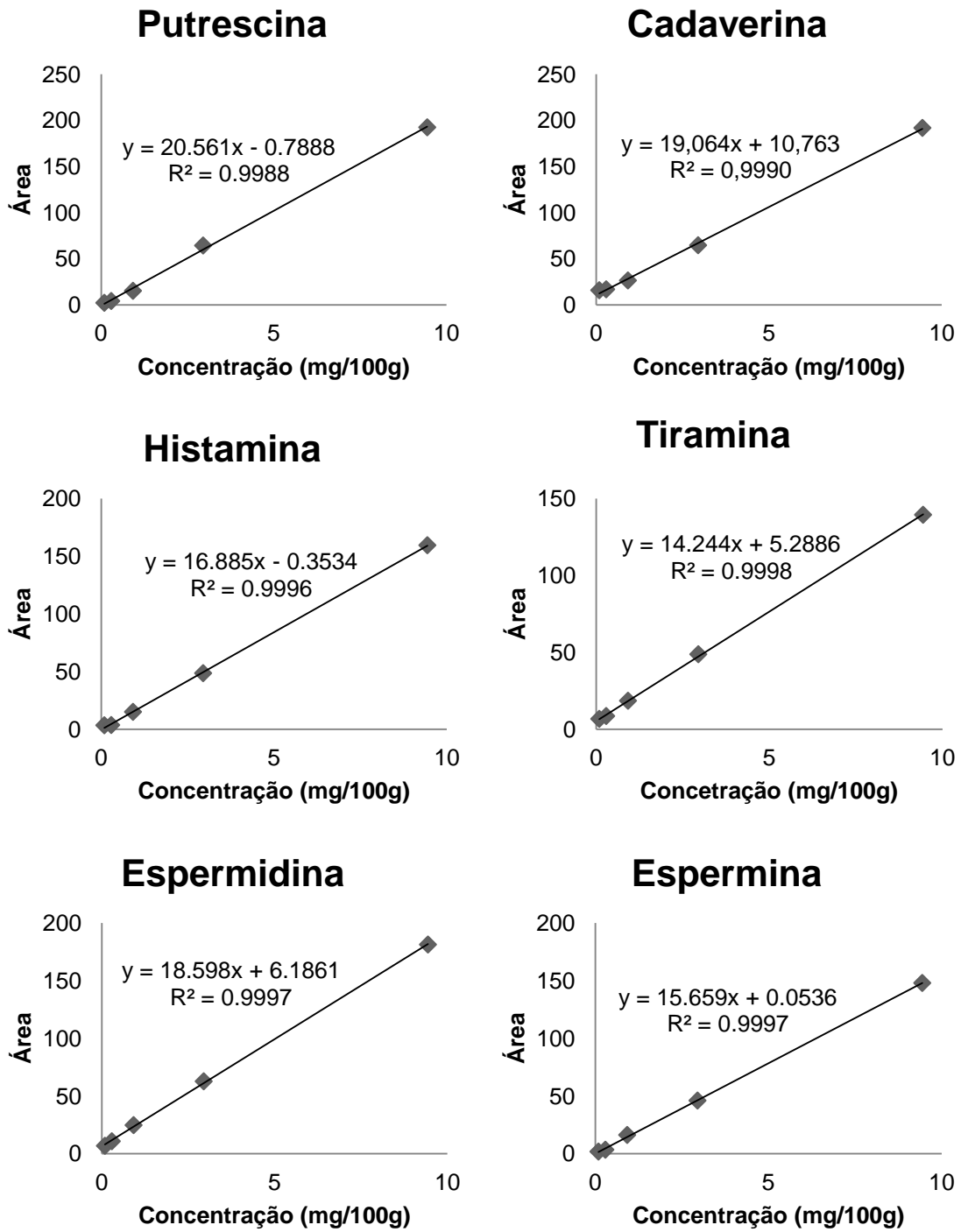


Figura 5. Curvas de linearidade das aminas adicionadas a matriz frango na faixa de 0,09 a 9,44 mg/100g

4.1.2. Seletividade

O cromatograma da Fig. 6 demonstra análises de água adicionada de solução padrão de seis aminas na concentração de 1,12 mg/100g.

Para a carne do peito de frango, os tempos de retenção médios das aminas

foram de $21,10 \pm 0,02$ min para putrescina; $21,91 \pm 0,05$ min para cadaverina; $22,40 \pm 0,04$ min para histamina; $25,43 \pm 0,02$ min para tiramina; $25,93 \pm 0,07$ min para espermidina e $28,99 \pm 0,01$ min para a espermina.

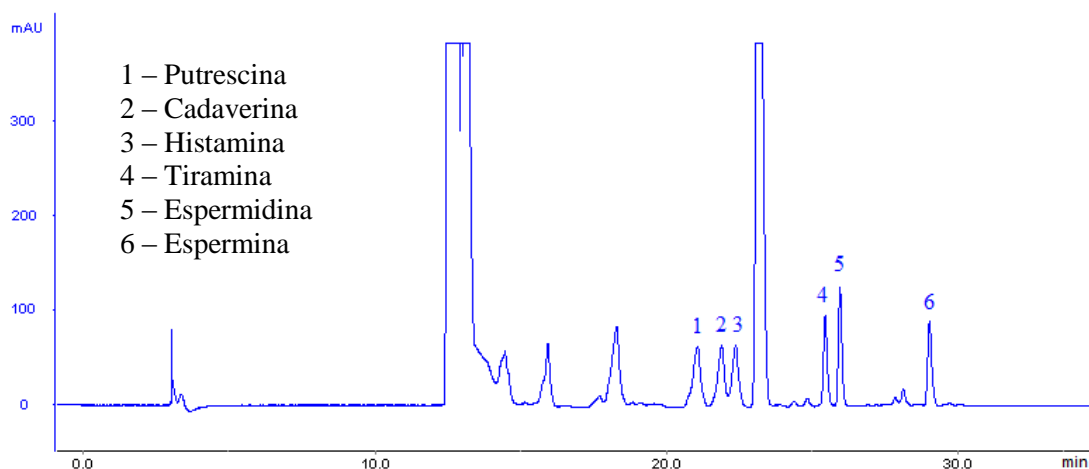


Figura 6. Adição de solução padrão das seis aminas à água (1,12 mg/100g)

As Fig. 7 e 8 representam, respectivamente, a matriz frango sem adição da solução padrão de aminas e

com adição de 9,44 mg/100g das seis aminas pesquisadas.

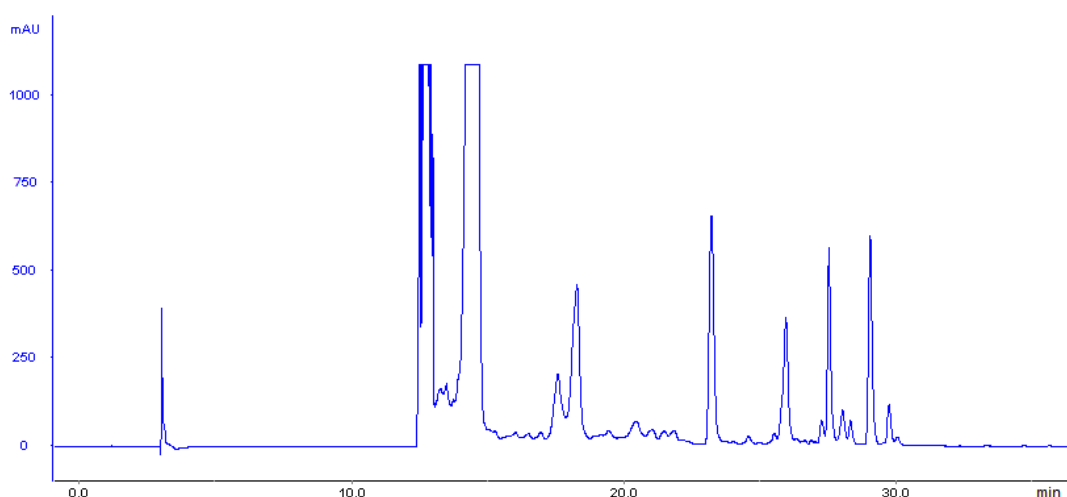


Figura 7. Carne de peito de frango sem adição de solução padrão

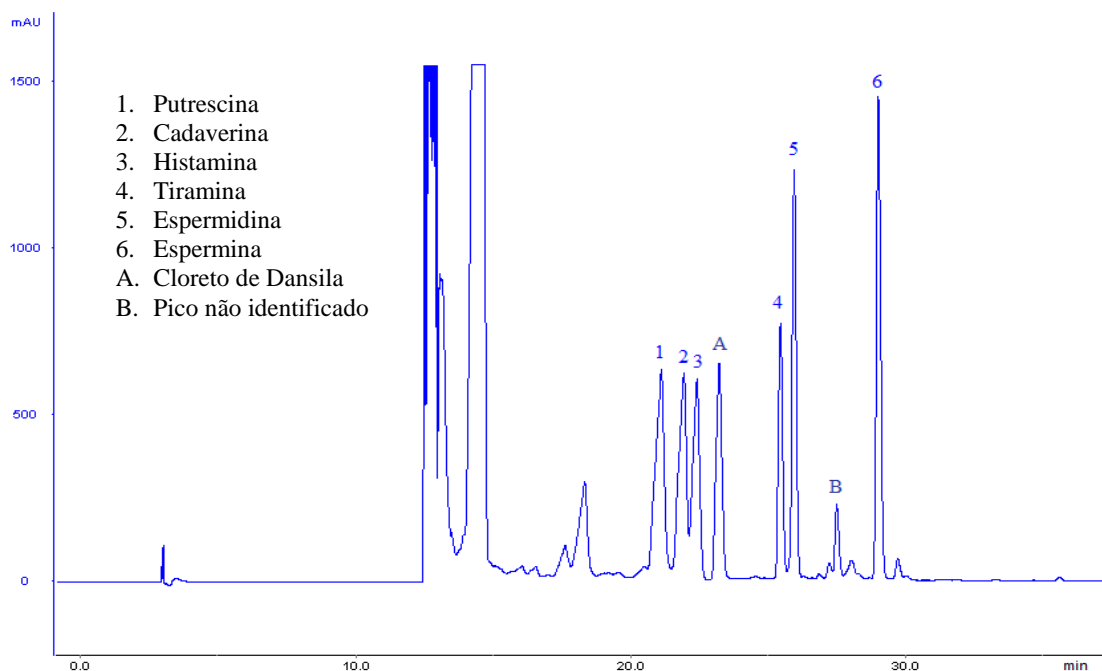


Figura 8. Adição de solução padrão à carne de peito frango (9,44 mg/100g)

Durante a corrida cromatográfica foi observada a presença de um pico elevado (A) que não pôde ser identificado. Provavelmente, este pico deve-se à utilização do cloreto de dansila como agente derivador.

Malle e Valle, (1996), também observaram o aparecimento de um pico interferente ao avaliarem diferentes protocolos para determinação de aminas em pescado e sugeriram que este pico poderia ser resultante de reações envolvendo o excesso de cloreto de dansila.

Innocente et al. (2007) observaram o aparecimento de um pico semelhante ao neutralizar diferentes concentrações de cloreto de dansila com L-prolina e destacaram a importância desse

procedimento para se evitar o aparecimento de um pico interferente.

Desse modo, é possível que a quantidade e L-prolina adicionada durante o processo de derivação não tenha sido suficiente para neutralizar todo o cloreto de dansila, permitindo o aparecimento desse pico.

Nas amostras da matriz frango também foi detectada a presença de outro pico de relevância (B), porém não identificado cuja presença não interferiu na separação e posterior quantificação das aminas na mesma.

Foi observado, por meio da comparação entre cromatogramas das amostras controle (solução padrão adicionada à água) e de carne de peito de frango, que quando houve a adição das aminas à

matriz frango, a detecção ocorreu no mesmo tempo de retenção das aminas adicionadas à água (Fig. 6), apresentando uma boa resolução. Desta forma, como os picos referentes às seis aminas puderam ser diferenciados dos outros compostos detectados presentes na matriz frango e também como os tempos de retenção das aminas nas matrizes foram os mesmos observados com a adição das aminas à água, o método pôde ser considerado seletivo.

4.1.3. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação do método para a matriz frango de todas as aminas avaliadas estão apresentados na Tab. 9. O limite de detecção do método para todas as aminas foi de 0,03 mg/100g. O limite de quantificação do método foi de 0,09 mg/100g para todas as aminas, com exceção da histamina, cujo limite de quantificação foi de 0,1 mg/100g, o maior de todas as aminas.

Tabela 9. Limites de detecção e de quantificação do método de CLAE/UV para a matriz frango

Aminas	LD (mg/100g)	LQ (mg/100g)
Putrescina	0,03	0,09
Cadaverina	0,03	0,09
Histamina	0,03	0,10
Tiramina	0,03	0,09
Espermidina	0,03	0,09
Espermina	0,03	0,09

Os valores obtidos para cada parâmetro foram calculados com base nas equações apresentadas no item 3.5.3.3.

4.1.4. Exatidão e precisão

Na Tab. 10 estão indicados os percentuais médios de recuperação e os coeficientes de variação (CV) obtidos na pesquisa de aminas bioativas na matriz frango. A exatidão do método foi avaliada através do percentual médio de recuperação e a precisão avaliada através do coeficiente de variação.

A taxa de recuperação de aminas na matriz frango variou de 70,02% para a putrescina a 120,9% para a histamina na concentração de 0,29 mg/100g, enquanto na concentração de 4,72 mg/100g a recuperação variou de 92,25% para a cadaverina a 105,2% para putrescina. Para a concentração de 9,44 mg/100g, a menor taxa de recuperação foi observada para a espermidina com 98,6% e a maior para a putrescina com 106,54% de recuperação.

Tabela 10. Recuperações médias e coeficientes de variação de aminas na matriz frango

Concentração (mg/100g)	Parâmetro	PUT	CAD	HIS	TIR	ESD	ESM
0,29	Recuperação (%)	70,02	70,76	120,90	104,60	99,75	100,39
	CV (%)	7,75	3,23	6,17	3,39	2,47	0,26
4,72	Recuperação (%)	105,20	92,25	100,28	101,50	98,19	100,49
	CV (%)	3,83	6,56	1,63	5,91	4,26	3,82
9,44	Recuperação (%)	106,54	99,46	102,17	102,27	98,63	102,48
	CV (%)	4,88	1,41	0,76	3,41	2,81	5,10

PUT, putrescina; CAD, cadaverina; HIS, histamina; TIR, tiramina; ESD, espermidina; ESM, espermina.

A exatidão, avaliada por meio da realização de ensaios de recuperação, é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo e este erro ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas, substâncias interferentes na amostra, entre outros (Brito et al., 2003). Desse modo, existe uma faixa de variação aceitável, na qual os resultados dos ensaios recuperação devem se enquadrar.

A exatidão da metodologia utilizada para quantificação de aminas na matriz frango está dentro do preconizado pela EC (2002) e Codex Alimentarius (2009), que determinam uma recuperação entre 70 a 110% e 80 a 110% respectivamente, para concentrações do analito maiores que 0,1 mg/100g. Entretanto, a recuperação de histamina na concentração de 0,29 mg/100g foi de 120,9%, não atendendo a essa especificação. Desse modo, dentro da faixa de 0,29 a 9,44 mg/100g, o método avaliado apresentou exatidão satisfatória para putrescina, cadaverina, tiramina, espermidina e espermina.

A precisão do método apresentou resultados satisfatórios para todas as seis aminas na faixa de 0,29 a 9,44 mg/100g.

Os coeficientes de variação (CV) dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação variaram de 0,26 a 7,75%. Esses valores estão dentro do preconizado pela EC (2002) e Codex Alimentarius (2009) que prevê um coeficiente de variação máximo de 10% para a concentração avaliada neste trabalho.

4.2. Resultados das pesquisas de aminas bioativas nas amostras de carne de peito de frango e no conteúdo interno de ovos de consumo

4.2.1. Resultados das análises de aminas bioativas em carne de peito de frangos de corte

Por se tratar de um produto perecível, a carne de frango exige a utilização do frio como método de conservação. Assim, para evitar a deterioração e garantir a segurança alimentar deste produto, os processos de armazenagem, distribuição e comercialização são realizados em temperaturas controladas, empregando-se a refrigeração ou o congelamento, de acordo com o tipo de produto. Desse modo, o clima característico de cada mesorregião não influencia na qualidade da carne, já que ela é um produto climatizado.

Os resultados das análises da pesquisa de aminas bioativas na carne de peito de frango de corte encontram-se na Tab. 11. Em todas as 160 amostras avaliadas, foi observada a presença de espermidina e espermina.

Foi observada a presença de putrescina e de cadaverina em 126 (78,75%) amostras. Destas 126 amostras positivas, a putrescina foi quantificada em 118 amostras (93,65%) enquanto a cadaverina foi quantificada em 109 (86,5%) amostras. Das 160 amostras analisadas, 130 (81,25%) foram positivas para histamina, mas apenas 63 destas (48,46%) estavam acima do limite de quantificação. A tiramina foi encontrada em 78 (48,75%) amostras, mas só pôde ser quantificada em 54 delas (69,23%). Espermidina e espermina estavam presentes em todas as amostras, em concentrações superiores ao limite de quantificação do método.

Os valores máximos encontrados para putrescina, cadaverina, histamina e tiramina foram de 2,026; 8,062; 0,985 e 2,214 mg/100g, respectivamente. Para espermidina os teores variaram de 1,460 até 11,426 mg/100g e para espermina de 3,442 até 7,424 mg/100g.

Tabela 11. Presença de aminas bioativas em carne de peito de frango, produzida no estado de Minas Gerais, de acordo com os limites de detecção e quantificação do método

Amina	ND	Abaixo do LQ	Quantificadas
Putrescina	34	8	118
Cadaverina	34	17	109
Histamina	30	67	63
Tiramina	82	24	54
Espermidina	0	0	160
Espermina	0	0	160

ND: Não detectado = abaixo do limite de detecção do método (<0,03 mg/100g). LQ: Limite de quantificação do método de cada amina.

Os resultados médios das análises de putrescina na carne de peito de frango encontram-se na Tab. 12. Não foi observada diferença ($P > 0,05$) na concentração desta amina entre as mesorregiões do estado de Minas Gerais dentro de cada estação do ano. Porém, nas mesorregiões Oeste de Minas e Triângulo Mineiro, os resultados encontrados na primavera, verão e outono foram semelhantes e superiores aos valores encontrados no inverno ($P < 0,05$).

Tabela 12. Médias dos teores de putrescina (mg/100g) encontrados em carne de peito de frango produzida no estado de Minas Gerais

Mesorregião	Estação (mg/100g)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Sul e Sudoeste	0,207	0,290	0,231	0,384
Campo das Vertentes	0,320	0,492	0,279	ND
Oeste de Minas	0,292a	0,263a	0,437a	0,027b
Metropolitana	0,324	0,437	0,295	0,074
Triângulo Mineiro	0,093a	0,324a	0,348a	NDb

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). ND: não detectado (<0,03mg/100g).

Os valores de putrescina encontrados no presente trabalho foram inferiores aos encontrados por Nassar e Emam (2002), que observaram em dois produtos à base de carne de frango (salsicha e lanche) valores de 15,59 mg/100g e 8,15 mg/100g, respectivamente. Balamatsia et al. (2006) também observaram valores elevados de putrescina (4,8 mg/100g) em carne de peito de frango comercializada na Grécia. Valores de putrescina superiores também foram encontrados por Lázaro et al. (2013), que detectaram teores médios de putrescina de 0,69 mg/100g em carne de peito de frango embalada em bandejas de poliestireno e de 0,67 mg/100g em amostras embaladas em sacos de polietileno.

Os valores de putrescina encontrados foram superiores aos encontrados por Patsias et al. (2006), que ao analisar filés de peito de frango pré-prontos, embalados em condições aeróbicas por até 23 dias, detectaram a concentração inicial de 0,08 mg/100g. Moreira et al. (2008) observaram o teor médio de putrescina de 0,043 mg/100g em carne de peito de frango analisada imediatamente após o abate. Kozová et al. (2009) também encontraram teores baixos de putrescina, próximos ao limite de detecção do método (0,1 mg/100g), em amostras de carne de peito de frango analisada 24 horas após o abate. Gallas et al. (2010), analisaram carne de peito de frango embalada em atmosfera modificada armazenada por até 14 dias e só detectaram esta amina a partir do 9º dia de armazenamento.

Os teores de putrescina encontrados foram baixos, provavelmente porque não

houve armazenamento da carne. Durante o armazenamento, pode ocorrer um aumento na concentração desta amina devido à descarboxilação da ornitina por enzimas microbianas. Balamatsia et al. (2006) analisaram carne de peito de frango refrigerada (4 °C) e armazenada por até 17 dias e encontraram teores iniciais de 4,8 mg/100g e, aos 17 dias, o valor encontrado foi de 35,4 mg/100g. Gallas et al. (2010) trabalharam com o armazenamento de carne de peito de frango embalada em dois tipos de atmosfera modificada e também verificaram este efeito, pois a putrescina só foi detectada a partir de nove dias de armazenamento, atingindo aos 14 dias, concentrações de 2,98 mg/100g (embalagem contendo 75% O₂ e 25% CO₂) e 6,06 mg/100g (embalagem contendo 75% N₂ e 25% CO₂).

Apesar de serem mais comuns os relatos de intoxicação por histamina e tiramina em alimentos e maior ênfase ser dada a detecção destas aminas, a pesquisa de putrescina também é importante, pois em concentrações elevadas pode levar a hipotensão, bradicardia, contração exagerada dos músculos da mandíbula, paralisia das extremidades e potencialização da toxicidade de outras aminas (Shalaby, 1996). Os teores de putrescina encontrados no presente trabalho não representam riscos à saúde do consumidor, desde que não haja associação com fármacos inibidores das monoaminoxidases, que podem reduzir a eficiência do sistema de detoxificação, principalmente de tiramina e histamina, e consumo de outros alimentos contendo níveis elevados de poliaminas, que uma vez somados, ultrapassem valores de

50,8 a 79,9 mg de espermidina ou 70,8 a 111,3 mg de espermina, que corresponde à ingestão diária de poliaminas recomendada para um adulto, segundo Bardócz et al. (1993).

Os resultados médios das análises de cadaverina na carne de peito de frango encontram-se na Tab. 13. Não foi observada diferença ($P>0,05$) de concentração desta amina entre as mesorregiões do estado de Minas Gerais dentro de cada estação do ano. Foi observado que, nas mesorregiões Sul e Sudoeste e Triângulo Mineiro, não

houve diferença em nenhuma estação do ano ($P>0,05$). Porém, na mesorregião do Campo das Vertentes, a carne de peito de frango coletada no inverno apresentou maior concentração de cadaverina quando comparadas aos resultados das amostras coletadas no verão. Nas mesorregiões Oeste de Minas e Metropolitana os teores médios de cadaverina encontrados nas amostras coletadas na estação do inverno foram mais altos, enquanto os mais baixos foram observados na estação do outono ($P<0,05$).

Tabela 13. Médias dos teores de cadaverina (mg/100g) encontrados em carne de peito de frango produzida no estado de Minas Gerais

Mesorregião	Estação (mg/100g)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Sul e Sudoeste	0,882	0,526	0,323	2,865
Campo das Vertentes	0,525ab	NDb	0,132ab	3,195a
Oeste de Minas	1,122ab	1,141ab	0,155b	1,903a
Metropolitana	0,231ab	0,300ab	0,074b	1,622a
Triângulo Mineiro	0,486	0,590	0,074	1,797

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P<0,05$). ND: não detectado ($<0,03\text{mg}/100\text{g}$).

Resultados similares foram observados por Lázaro et al. (2013), que detectaram cadaverina em concentrações variando de 0,137 mg/100g a 0,896 mg/100g em carne de peito de frango embalada em bandejas de poliestireno e de 0,118 a 0,973 mg/100g em carne de peito de frango embalada em sacos de polietileno. Resultados semelhantes, também foram obtidos por Balamatsia et al. (2006), que encontraram valores médios de cadaverina de 0,85 mg/100g em carne de peito de frango analisada no dia zero de armazenamento.

Os teores de cadaverina encontrados foram inferiores aos observados por Nassar e Emam (2002), que detectaram em dois produtos à base de carne de frango (salsicha e lanche) concentrações de 3,14 mg/100g e 3,71 mg/100g, respectivamente. Os maiores teores de cadaverina observados por estes autores podem ser justificados, pois durante o processamento destes produtos ocorre maior manipulação, além de necessitarem de maior tempo para preparo, e, conseqüentemente, a contaminação microbiana será mais elevada.

Concentrações inferiores de cadaverina foram encontradas por Patsias et al. (2006) que, ao avaliarem filés de peito de frango pré-prontos embalados em condições aeróbicas e armazenados por até 23 dias, detectaram a concentração inicial de 0,02 mg/100g de cadaverina. Silva e Glória (2002) avaliaram carne de peito de frango refrigerada ($4,0 \pm 1$ °C) e armazenada por até 15 dias e só detectaram esta amina no 15º dia de estocagem, na concentração de 0,43 mg/100g. Baston et al. (2010) também só detectaram esta amina em cortes de frango refrigerados (4 ± 1 °C) a partir do 5º dia de armazenamento e a concentração final encontrada foi de 0,8 mg/100g aos 7 dias. Gallas et al. (2010) também não detectaram esta amina no início do período de armazenamento de carne de peito de frango embalada em atmosfera modificada.

Assim como na putrescina, existe uma tendência de aumento nas concentrações de cadaverina ao longo do período de armazenamento, conforme demonstrado por Silva e Glória (2002) e Baston et al. (2010), que não detectaram esta amina no início do período de armazenamento, mas a encontraram após 15 e 5 dias de estocagem, respectivamente. No presente trabalho, não houve armazenamento da carne e provavelmente devido a isso, os níveis encontrados na maioria das amostras foram baixos. Silla-Santos (1998) relata que a lisina pode ser descarboxilada e convertida em cadaverina pelos micro-organismos *E. aerogenes*, *P. fluorescens*, *E. coli* e *S. liquefaciens*. Dessa forma, durante o processamento e o armazenamento dos

produtos, devem ser empregadas condições higiênico-sanitárias adequadas, a fim de minimizar a contaminação bacteriana e, conseqüentemente, a formação desta amina.

A cadaverina é uma amina que possui ação vasoativa e, assim como a putrescina, pode provocar hipotensão, bradicardia ou potencializar a toxicidade de outras aminas, principalmente de histamina e tiramina (Shalaby, 1996). No entanto, os teores de cadaverina encontrados foram baixos e não representam riscos à saúde do consumidor, desde que não haja consumo concomitante de alimentos com elevados teores de poliaminas ou associação com fármacos inibidores das monoaminoxidases podem levar a perda de eficiência do sistema de detoxificação e causar agravo à saúde.

Os resultados médios das análises de histamina na carne de peito de frango encontram-se na Tab. 14. Não foi observada diferença ($P>0,05$) na concentração desta amina entre as mesorregiões do estado de Minas Gerais dentro de cada estação do ano. Para esta amina não foi observada nenhuma diferença entre as estações do ano nas mesorregiões Campo das Vertentes, Oeste de Minas, Metropolitana e Triângulo Mineiro ($P>0,05$). No entanto, na mesorregião Sul e Sudoeste foi observada diferença entre as estações do ano, pois a carne de peito de frango no inverno apresentou valores mais elevados de histamina em relação às amostras coletadas no verão ($P<0,05$).

Tabela 14. Médias dos teores de histamina (mg/100g) encontrados em carne de peito de frango produzida no estado de Minas Gerais

Mesorregião	Estação (mg/100g)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Sul e sudoeste	0,059ab	0,038b	0,077ab	0,391a
Campo das Vertentes	0,043	0,174	ND	0,043
Oeste de Minas	0,085	0,065	0,098	0,127
Metropolitana	0,035	0,139	ND	0,152
Triângulo Mineiro	ND	0,090	ND	0,188

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). ND: não detectado ($< 0,03$ mg/100g).

Concentrações superiores de histamina foram detectadas por Patsias et al. (2006), que encontraram a concentração inicial desta amina de 0,19 mg/100g em filés de peito de frango pré-prontos, embalados em condições aeróbicas. Nassar e Emam (2002) também verificaram concentrações superiores de histamina, de 4,5 mg/100g e 2,3 mg/100g, em salsichas de frango e lanche, respectivamente.

Os teores de histamina encontrados foram baixos. Porém, na maioria das mesorregiões e estações do ano, os valores encontrados estavam acima do limite de detecção do método, e, dessa forma, foram superiores aos observados por Silva e Glória (2002), que não detectaram histamina até o 10º dia de armazenamento em carne de peito de frango estocada a $4,0 \pm 1^\circ\text{C}$. Balamatsia et al. (2006) também não detectaram histamina até o 11º dia de armazenamento de carne de peito de frango refrigerada (4°C). Gallas et al. (2010) observaram a presença de histamina em carne de peito de frango embalada em atmosfera modificada (75% N_2 e 25% CO_2) somente após nove dias de estocagem, e a concentração final

verificada aos 14 dias de armazenamento foi de 0,16 mg/100g.

A importância desta amina em alimentos está relacionada às intoxicações e reações alérgicas de caráter agudo que as mesmas podem desencadear. Valores baixos desta amina são capazes de causar agravo à saúde, dependendo da susceptibilidade do indivíduo. Em pescado, a pesquisa desta amina já é uma exigência. De acordo com a Portaria nº 185 de 1997, do MAPA, o nível máximo permitido de histamina no músculo, nas espécies pertencentes às famílias Scombridae, Scombrocidae, Clupeidae e Coryphaenidae, é de 10 mg/100g (BRASIL, 1997). Os valores encontrados no presente trabalho são muito inferiores e não representam risco à saúde do consumidor.

Os resultados médios das análises de tiramina na carne de peito de frango encontram-se na Tab. 15. De forma semelhante à histamina, houve diferença entre as estações do ano apenas na mesorregião Sul e Sudoeste, em que os teores de tiramina encontrados no inverno foram maiores que os observados no verão ($P < 0,05$). Não foi observada diferença ($P > 0,05$) de

concentração desta amina entre as mesorregiões do estado de Minas Gerais dentro de cada estação do ano.

As concentrações de tiramina observadas foram consideravelmente inferiores às encontrados por Nassar e Emam (2002) que verificaram os teores de 8,15 mg/100g e 7,95 mg/100g em salsichas de frango e lanche, respectivamente. Lázaro et al. (2013) também encontraram valores elevados em amostras de carne de peito de frango embaladas em bandejas de poliestireno (23,07

mg/100g) e em sacos de polietileno (19,54 mg/100g).

No presente trabalho, a tiramina foi observada em 78 amostras (24 detectadas e 54 quantificadas), ao contrário de Silva e Glória (2002), que não encontraram esta amina em carne de peito de frango até o 15º dia de armazenamento e Gallas et al. (2010), que detectaram esta amina somente após 9 dias de estocagem em peitos de frango armazenados em atmosfera modificada (75% N₂ 25% CO₂).

Tabela 15. Médias dos teores de tiramina (mg/100g) encontrados em carne de peito de frango produzida no estado de Minas Gerais

Mesorregião	Estação (mg/100g)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Sul e Sudoeste	0,063ab	NDb	NDab	0,943a
Campo das Vertentes	0,080	ND	ND	0,374
Oeste de Minas	0,377	0,072	0,048	0,240
Metropolitana	ND	0,033	0,049	0,186
Triângulo Mineiro	ND	ND	ND	0,192

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05). ND: não detectado (<0,03mg/100g).

A importância da pesquisa de tiramina em alimentos reside no fato de já terem sido descritos vários casos de intoxicação por esta amina, principalmente pela ingestão de queijos e bebidas alcoólicas. Aproximadamente 30% dos indivíduos com enxaqueca clássica podem ter crise quando consomem alimentos ricos em tiramina (Glória e Vieira, 2007). No entanto, as concentrações de tiramina encontradas foram baixas e inferiores ao limite máximo de 10 a 80 mg/100g sugerido por Brink et al. (1990), não representando riscos à saúde do consumidor.

Os resultados médios das análises de espermidina na carne de peito de frango encontram-se na Tab. 16. Não foi observada diferença (P>0,05) de concentração desta amina entre as mesorregiões do estado de Minas Gerais dentro de cada estação do ano. Não houve diferença (P>0,05) na concentração de espermidina na carne de peito de frango entre as estações do ano nas mesorregiões Campo das Vertentes e Metropolitana. Em relação à mesorregião Sul e Sudoeste, no inverno as concentrações de espermidina na carne de peito de frango (5,672 mg/100g) foram mais elevadas (P<0,05).

Tabela 16. Médias dos teores de espermidina (mg/100g) encontrados em carnes de peitos de frangos produzida no estado de Minas Gerais

Mesorregião	Estação (mg/100g)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Sul e sudoeste	2,885b	2,571b	2,057b	5,672a
Campo das Vertentes	3,729	1,868	2,198	4,410
Oeste de Minas	3,582ab	2,940ab	2,666b	5,526a
Metropolitana	2,927	2,832	2,707	5,364
Triângulo Mineiro	5,452a	3,107b	2,443b	6,219a

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Quanto à mesorregião Oeste de Minas, os maiores teores de espermidina na carne de peito de frango foram encontrados no inverno, e os menores no outono. As demais estações foram semelhantes a todos os tratamentos ($P < 0,05$). Em relação à mesorregião do Triângulo Mineiro, as concentrações de espermidina na carne de peito de frango no inverno e na primavera foram mais elevadas quando comparadas aos teores observados no verão e no outono ($P < 0,05$).

Os resultados da pesquisa de espermidina obtidos no presente estudo, foram similares aos encontrados por Moreira et al. (2008), que observaram a concentração média de 2,74 mg/100g em carne de peito de frango maturada (1 a 5,7 °C por oito horas).

Resultados inferiores foram encontrados por Silva e Glória (2002), que detectaram espermidina na concentração de 0,73 mg/100g em amostras de carne de peito de frango analisada imediatamente após o abate das aves. Balamatsia et al. (2006) também encontraram níveis inferiores de espermidina em peito de frango e o teor inicial observado foi de 0,79 mg/100g. Kozová et al. (2009) verificaram valores

baixos de espermidina (0,484 mg/100g) em carne de peito de frango resfriada. Gallas et al. (2010) de forma semelhante, observaram o teor médio de 0,75 mg/100g em carne de peito de frango embalada em atmosfera modificada. Baston et al. (2010) também encontraram concentrações mais baixas de espermidina, com média de 0,65 mg/100g em carne de coxa e 0,5 mg/100g em carne de peito de frango. Lázaro et al. (2013) encontraram valores médios de espermidina de 0,98 mg/100g em carne de peito de frango embalada em bandejas de poliestireno e 1,077 mg/100g em amostras embaladas em sacos de polietileno.

Valores de espermidina superiores foram observados por Patsias et al. (2006), que encontraram a concentração inicial de 18,88 mg/100g em filés de peito de frango pré-prontos, armazenados por até 23 dias.

Embora a espermidina seja importante no metabolismo e diferenciação celular (Bover-Cid et al., 2008) e na regulação de ácidos nucleicos e síntese de proteínas (Kalác e Krausová, 2005), esta amina pode estar relacionada com o desenvolvimento de tumores. Na presença de nitrito, já foi comprovado

que a espermidina pode levar a formação de nitrosaminas, que são compostos potencialmente carcinogênicos (Bardócz, 1995). Diante disso, os elevados índices de espermidina encontrados neste trabalho sugerem que a carne de peito de frango representa uma importante fonte de poliaminas desejáveis e necessárias para o consumo, principalmente por pessoas debilitadas e acamadas, porém, a ingestão diária máxima de poliaminas recomendada, de 50,8 a 79,9 mg de espermidina ou 70,8 a 111,3 mg de espermina, deve ser respeitada para que não haja prejuízo à saúde do indivíduo (Bardócz et al., 1993).

Os resultados médios das análises de espermina na carne de peito de frango encontram-se na Tab. 17. Os teores médios desta amina foram semelhantes em todas as mesorregiões do estado de Minas Gerais e estações do ano ($P > 0,05$).

Os teores de espermina encontrados foram similares aos observados por Balamatsia et al. (2006) que verificaram a concentração inicial de 5,33 mg/100g em carne de peito de frango refrigerada e armazenada por até 17 dias.

Valores inferiores de espermina foram encontrados por Silva e Glória (2002)

que observaram concentrações iniciais desta amina de 1,79 mg/100g em carne de peito de frango armazenada a $4,0 \pm 1$ °C por até 15 dias. Patsias et al. (2006) observaram o teor inicial de espermina de 1,15 mg/100g em filés de peito de frango pré-prontos, embalados em condições aeróbicas e armazenados por até 23 dias. Moreira et al. (2008) encontraram concentrações de espermina de 2,95 mg/100g em carne de peito de frango analisada 24 horas após o abate e de 3,87 mg/100g em carne de peito de frango maturada (1 a 5,7 °C por oito horas). Kozová et al. (2009) ao analisar carne de peito de frango 24 horas após o abate, encontraram o teor de espermina de 3,68 mg/100g. Baston et al. (2010) encontraram o teor inicial desta amina de 2,2 mg/100g em carne de peito de frango armazenada por até sete dias. Gallas et al. (2010) verificaram a concentração inicial de espermina de 1,78 mg/100g em amostras de carne de peito de frango embaladas em atmosfera modificada armazenadas por até 14 dias a 2-4°C. Lázaro et al. (2013) encontraram teores médios de espermina de 1,603 mg/100g em carne de peito de frango embalada em bandejas de poliestireno e de 1,898 mg/100g em amostras embaladas em sacos de polietileno.

Tabela 17. Médias dos teores de espermina (mg/100g) encontrados em carnes de peitos de frangos produzida no estado de Minas Gerais

Mesorregião	Estação (mg/100g)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Sul e sudoeste	5,970	5,761	5,637	5,785
Campo das Vertentes	6,027	4,849	5,433	6,496
Oeste de Minas	5,975	5,823	5,954	5,857
Metropolitana	6,138	5,613	6,292	5,394
Triângulo Mineiro	5,534	5,493	5,472	4,915

Da mesma forma que a espermidina, os índices de espermina encontrados neste trabalho demonstram a importância nutricional da carne de peito de frango como fonte de poliaminas desejáveis na dieta. No entanto, o somatório dos níveis de poliaminas encontrados na carne de peito de frango, foi inferior a ingestão diária recomendada de poliaminas de 50,8 a 79,9 mg de espermidina ou 70,8 a 111,3 mg de espermina, e não é suficiente para comprometer o sistema de detoxificação de amins e causar agravo à saúde do consumidor (Bardócz, et al., 1993).

4.2.2. Resultados das análises de amins bioativas no conteúdo interno dos ovos

Os limites de detecção do método (Tab. 18) para a matriz gema variaram de 0,02

mg/100g (putrescina, histamina, tiramina e espermidina) a 0,03 mg/100g (feniletilamina, cadaverina e espermina) e os limites de quantificação foram de 0,07 mg/100g para putrescina, histamina e espermidina; de 0,08 mg/100g para tiramina e; de 0,10 mg/100g para feniletilamina, cadaverina e espermina.

Para a matriz albúmen, os limites de detecção do método foram de 0,02 mg/100g para putrescina, cadaverina, histamina e tiramina; 0,03 mg/100g para espermidina e espermina e 0,04 mg/100g para a feniletilamina. Os limites de quantificação do método foram de 0,07 mg/100g para putrescina e histamina; 0,08 mg/100g para cadaverina e tiramina; 0,09 mg/100g para espermidina; 0,10 mg/100g para espermina e 0,11 mg/100g para feniletilamina.

Tabela 18. Limites de detecção e de quantificação das amins pesquisadas pelo método de CLAE-UV para as matrizes gema e albúmen

Matriz	Amins	Limite de detecção (mg/100g)	Limite de quantificação (mg/100g)
Gema	Feniletilamina	0,03	0,10
	Putrescina	0,02	0,07
	Cadaverina	0,03	0,10
	Histamina	0,02	0,07
	Tiramina	0,02	0,08
	Espermidina	0,02	0,07
	Espermina	0,03	0,10
	Feniletilamina	0,04	0,11
Albúmen	Putrescina	0,02	0,07
	Cadaverina	0,02	0,08
	Histamina	0,02	0,07
	Tiramina	0,02	0,08
	Espermidina	0,03	0,09
	Espermina	0,03	0,10

Os resultados das análises da pesquisa de aminas bioativas na gema e no albúmen encontram-se na Tab. 19. Na matriz gema, a amina encontrada em maior número de amostras, 56, foi a putrescina e a mesma foi quantificada em 46 amostras. A espermina não foi detectada em nenhuma amostra. A espermidina foi detectada em seis amostras, mas não pôde ser quantificada. A cadaverina estava presente em 44 amostras analisadas, sendo que em 40 dessas amostras foi quantificada. A histamina e a tiramina foram encontradas em 18 das 56 amostras, sendo que a histamina foi quantificada em nove amostras e a tiramina em cinco. A feniletilamina estava presente em três das 56 amostras analisadas, porém só pôde ser quantificada em uma delas. Na matriz albúmen, a putrescina também foi a amina encontrada em maior número de amostras, seguida da cadaverina. Todas

as amostras foram positivas para putrescina e das 56 amostras analisadas, apenas três estavam abaixo do limite de quantificação do método, enquanto as 53 amostras restantes puderam ser quantificadas. Das 56 amostras de albúmen analisadas, 55 foram positivas para cadaverina e destas, todas puderam ser quantificadas. Para feniletilamina, 52 amostras foram positivas e dessas, 40 puderam ser quantificadas. Para a histamina, 39 amostras foram positivas e destas, todas puderam ser quantificadas. A tiramina estava presente em apenas uma amostra, em concentração superior ao limite de quantificação do método. A espermidina foi encontrada em 11 amostras, e pôde ser quantificada em todas elas, enquanto a espermina foi observada em apenas uma amostra, em concentração superior ao limite de quantificação do método.

Tabela 18. Presença de aminas bioativas no conteúdo interno de ovos de consumo, produzidos no estado de Minas Gerais, de acordo com os limites de detecção e quantificação do método

Matriz	Amina Pesquisada	ND		Abaixo do LQ		Quantificadas	
		n	%	n	%	n	%
Gema	Feniletilamina	53	94,64	2	3,57	1	1,79
	Putrescina	0	0,00	10	17,86	46	82,14
	Cadaverina	12	21,43	4	7,14	40	71,43
	Histamina	38	67,86	9	16,07	9	16,07
	Tiramina	38	67,86	13	23,21	5	8,93
	Espermidina	50	89,29	6	10,71	0	0,00
	Espermina	56	100,00	0	0,00	0	0,00
Albúmen	Feniletilamina	4	7,14	12	21,43	40	71,43
	Putrescina	0	0,00	3	5,36	53	94,64
	Cadaverina	1	1,79	0	0,00	55	98,21
	Histamina	17	30,36	0	0,00	39	69,64
	Tiramina	55	98,21	0	0,00	1	1,79
	Espermidina	45	80,36	0	0,00	11	19,64
	Espermina	55	98,21	0	0,00	1	1,79

ND: Não detectado = abaixo do limite de detecção do método para cada amina.

LQ: Limite de quantificação do método.

Os resultados médios das análises de feniletilamina na gema e no albúmen encontram-se na Tab. 20. Não foram observadas diferenças entre as estações do ano e nem entre as mesorregiões do estado de Minas Gerais para os valores de feniletilamina ($P > 0,05$). Na gema não

foi observada a presença desta amina em nenhuma das mesorregiões durante a estação chuvosa. Na estação seca, também não foi observada sua presença nas mesorregiões Sul e Sudoeste e Triângulo Mineiro.

Tabela 20. Médias dos teores de feniletilamina (mg/100g) encontrados no conteúdo interno de ovos produzidos no estado de Minas Gerais

Mesorregião	Estação (mg/100g)			
	Seca		Chuvosa	
	Albúmen	Gema	Albúmen	Gema
Sul e sudoeste	0,09647	ND	0,0972	ND
Campo das Vertentes	0,11103	< LQ	0,1100	ND
Oeste de Minas	0,18142	< LQ	0,0817	ND
Metropolitana	0,11566	0,0672	0,1147	ND
Triângulo Mineiro	0,08767	ND	0,1043	ND

ND: Não detectado (<0,03 mg/100g de gema e <0,04 mg/100g de albúmen). LQ: Limite de Quantificação (0,1 mg/100g).

Os valores de feniletilamina observados foram próximos aos valores encontrados por Figueiredo (2012) que verificou, ao longo de 125 dias de armazenamento, que a concentração média inicial de feniletilamina no albúmen dos ovos foi de 0,161 mg/100g, e a concentração final, observada aos 125 dias, foi de 0,112 mg/100g.

Figueiredo et al. (2013), no entanto, ao analisarem ovos de poedeiras de 30 e 60 semanas de idade, armazenados em temperatura ambiente (25°C) por 28 dias, observaram níveis de feniletilamina muito superiores e detectaram as concentrações iniciais de 2,95 e 2,55 mg/100g em albumens de ovos de poedeiras de 30 e 60 semanas de idade, respectivamente.

A pesquisa desta amina em alimentos é importante porque ela pode levar à

intoxicação, cujos sinais são aumento da pressão arterial e enxaqueca. As concentrações médias de feniletilamina observadas no presente trabalho foram baixas, e inferiores ao limite máximo de 3,0 mg/100g de alimento sugerido por Brink et al. (1990), não representando riscos à saúde do consumidor.

Os resultados médios das análises de putrescina na gema encontram-se na Tab. 21. Para estes resultados as análises apresentaram distribuição normal e não foram observadas diferenças entre as estações do ano nem entre as mesorregiões do estado de Minas Gerais ($P > 0,05$).

Os resultados médios das análises de putrescina no albúmen encontram-se na Tab. 22. No albúmen, ao contrário do observado na gema, houve diferença significativa ($P < 0,05$) nas concentrações

desta amina entre as mesorregiões do estado de Minas Gerais dentro das estações seca e chuvosa. Na estação seca, o menor teor médio encontrado foi na região Oeste de Minas e na estação chuvosa, a menor concentração desta amina foi observada na região Sul e

Sudoeste. Entre as mesorregiões, os teores encontrados foram semelhantes entre si, exceto na região Oeste de Minas, em que a estação seca apresentou a menor concentração de putrescina quando comparada com a estação chuvosa.

Tabela 21. Médias dos teores de putrescina (mg/100g) encontrados nas gemas de ovos produzidos no estado de Minas Gerais

Mesorregião	Estação (mg/100g)		Média
	Seca	Chuvosa	
Sul e sudoeste	0,105	0,082	0,094
Campo das Vertentes	0,099	0,112	0,106
Oeste de Minas	0,109	0,100	0,104
Metropolitana	0,051	0,070	0,060
Triângulo Mineiro	0,091	0,091	0,091
Média	0,094	0,093	

Tabela 22. Médias dos teores de putrescina (mg/100g) encontrados no albúmen de ovos produzidos no estado de Minas Gerais

Mesorregião	Estação (mg/100g)	
	Seca	Chuvosa
Sul e sudoeste	0,141Aa	0,094Ba
Campo das Vertentes	0,153Aa	0,137Aa
Oeste de Minas	0,083Bb	0,151Aa
Metropolitana	0,115Aa	0,136Aa
Triângulo Mineiro	0,127Aa	0,131Aa

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). CV = 29,1%

Os resultados de putrescina encontrados foram similares aos observados por Figueiredo (2012), que encontrou o teor inicial de 0,165 mg/100g na gema e de 0,161 mg/100g no albúmen de ovos armazenados por até 125 dias sob refrigeração.

Os valores de putrescina verificados na gema e no albúmen dos ovos, foram inferiores aos observados por Saito et al. (1992), que detectaram a concentração de 1,52 mg/100g. Porém, estes autores

avaliaram ovos deteriorados e os níveis encontrados foram maiores devido à atividade microbiana.

Concentrações inferiores desta amina foram encontrados por Bardócz et al. (1995), que detectaram, em ovos cozidos, concentrações que variaram entre 0,026 mg/100g a 0,035 mg/100g. Lima et al. (2006) encontraram esta amina apenas em níveis de traços, em ovos comercializados em supermercados.

No albúmen, a diferença entre os níveis de putrescina observados entre as mesorregiões dentro das estações seca e chuvosa poderiam ser justificados pelas diferentes temperaturas máximas e mínimas observadas em cada mesorregião, pois ao contrário da carne de frango, que é comercializada congelada ou refrigerada e não sofre influência da temperatura ambiente, os ovos são comercializados em temperatura ambiente, o que pode influenciar diretamente sua qualidade. Segundo Kalač e Krausová (2005), em alimentos de origem animal, o conteúdo de aminas, como a putrescina, aumenta devido à atividade bacteriana durante o seu processamento e armazenamento inadequados. Deste modo, de acordo com as diferentes temperaturas máximas e mínimas típicas de cada mesorregião, os ovos podem sofrer variações no perfil e na contagem de micro-organismos e, conseqüentemente, nos níveis de putrescina. Na estação seca, os menores níveis de putrescina foram encontrados na região Oeste de Minas que apresentou a menor temperatura mínima quando

comparada as demais mesorregiões e na estação chuvosa, os menores teores desta amina foram observados na região Sul e Sudoeste, que apresentou a menor temperatura mínima quando comparada as demais mesorregiões dentro dessa estação (Tab. 5).

Os resultados médios das análises de cadaverina na gema e no albúmen encontram-se na Tab. 23. Para estas análises não foram observadas diferenças para os valores de cadaverina encontrados, entre as estações do ano e as mesorregiões do estado de Minas Gerais ($P>0,05$).

Figueiredo (2012) encontrou valores próximos aos obtidos neste trabalho. A concentração média de cadaverina nas gemas de ovos armazenados por até 125 dias, variou entre 0,301 mg/100g no primeiro dia e 0,150 mg/100g no último dia de armazenamento. No albúmen, este autor encontrou teores de cadaverina de 0,210 mg/100g no início e de 0,171 mg/100g no final do período de armazenamento de 125 dias.

Tabela 23. Médias dos teores de cadaverina (mg/100g) encontrados no conteúdo interno de ovos produzidos no estado de Minas Gerais

Mesorregião	Estação (mg/100g)			
	Seca		Chuvosa	
	Albúmen	Gema	Albúmen	Gema
Sul e sudoeste	0,209	0,604	0,162	0,469
Campo das Vertentes	0,157	0,434	0,172	0,359
Oeste de Minas	0,219	0,069	0,237	0,226
Metropolitana	0,166	0,195	0,185	1,510
Triângulo Mineiro	0,136	0,311	0,140	0,170

Os teores médios de cadaverina encontrados foram muito inferiores aos encontrados por Saito et al. (1992), que trabalhando com ovos deteriorados,

observaram valores de até 5,52 mg/100g dessa amina. Este valor tão alto encontrado por estes autores é justificado pelo fato de que os ovos estavam

deteriorados e por esse motivo houve uma ação de enzimas microbianas, capazes descarboxilar lisina, como é o caso de alguns micro-organismos da família Enterobacteriaceae (Halász et al., 1994; Shalaby, 1996).

Resultados inferiores foram encontrados por Okamoto et al. (1997) que verificaram valores de cadaverina de 0,05 mg/100g em ovos *in natura* e cozidos. Nishimura et al. (2006) também encontraram baixos teores de cadaverina no albúmen (0,02 mg/100g). Contudo, na gema, os valores observados por Nishimura et al. (2006) foram muito superiores aos verificados (2,66 mg/100g).

A exemplo do que foi discutido anteriormente, apesar de serem mais comuns os relatos de intoxicação por histamina e tiramina em alimentos, a pesquisa de cadaverina também é importante, pois assim como a putrescina, em concentrações elevadas,

ela pode provocar hipotensão, bradicardia, contração exagerada dos músculos da mandíbula, paralisia das extremidades e potencialização da toxicidade de outras aminas (Shalaby, 1996). Além disso, a cadaverina é um importante indicador de deterioração dos alimentos, pois ela pode ser formada a partir da descarboxilação da lisina pela ação de enzimas microbianas.

Os níveis de cadaverina observados foram baixos, e apesar de serem transportados e comercializados em temperatura ambiente, os ovos analisados tem qualidade satisfatória, baseando-se nos teores de cadaverina encontrados, e não representam riscos à saúde do consumidor.

Os resultados médios das análises de histamina na gema e no albúmen encontram-se na Tab. 24. Não foram observadas diferenças entre as estações do ano e nem entre as mesorregiões do estado de Minas Gerais ($P > 0,05$).

Tabela 24. Médias dos teores de histamina (mg/100g) encontrados no conteúdo interno de ovos produzidos no estado de Minas Gerais

Mesorregião	Estação (mg/100g)			
	Seca		Chuvosa	
	Albúmen	Gema	Albúmen	Gema
Sul e sudoeste	0,283	0,011	0,106	0,026
Campo das Vertentes	0,224	0,026	0,196	0,035
Oeste de Minas	0,031	0,017	0,252	0,013
Metropolitana	0,096	ND	0,221	0,022
Triângulo Mineiro	1,344	0,056	0,316	0,008

ND : não detectado (<0,02mg/100g).

Saito et al. (1992), Okamoto et al (1997), Ramos et al. (2009) e Figueiredo (2012) não encontraram ou encontraram valores abaixo do limite de detecção de

histamina em ovos. No entanto, Moudgal et al. (1991) detectaram histamina (0,0765 mg/100g) na gema de ovos frescos, assim como no presente

trabalho, em que foram encontrados baixos teores de histamina, tanto na gema quanto no albúmen dos ovos analisados.

Os teores encontrados no presente trabalho foram muito inferiores a dose tóxica de 50 a 100 mg/100g e ao limite máximo de 10 mg/100g de alimento, sugeridos por Brink et al. (1990), assim, o consumo deste produto não oferece riscos à saúde do consumidor.

Os resultados médios das análises de tiramina na gema e no albúmen encontram-se na Tab. 25. Para estas análises também não foram observadas diferenças entre as estações do ano e nem entre as mesorregiões do estado de Minas Gerais ($P > 0,05$).

Foi observado que a tiramina só pôde ser detectada na gema, com exceção da mesorregião Sul e Sudoeste, em que esta amina foi quantificada no albúmen, durante a estação chuvosa.

Tabela 25. Médias dos teores de tiramina (mg/100g) encontrados no conteúdo interno de ovos produzidos no estado de Minas Gerais

Mesorregião	Estação (mg/100g)			
	Seca		Chuvosa	
	Albúmen	Gema	Albúmen	Gema
Sul e sudoeste	ND	0,026	0,017	0,028
Campo das Vertentes	ND	0,017	ND	0,011
Oeste de Minas	ND	0,258	ND	ND
Metropolitana	ND	0,228	ND	0,031
Triângulo Mineiro	ND	0,032	ND	0,004

ND: não detectado (<0,02mg/100g).

As concentrações de tiramina obtidas no presente trabalho foram baixas e consideravelmente inferiores ao limite máximo de 10 a 80 mg/100g sugerido por Brink et al. (1990), não representando risco à saúde do consumidor. Porém, o consumo de alimentos com elevados teores de outras aminas, como putrescina e cadaverina, pode reduzir a eficiência do sistema de detoxificação da tiramina e aumentar a susceptibilidade do indivíduo à intoxicação por esta amina, que pode vir a manifestar sintomas como crises hipertensivas, enxaquecas e alterações

cardíacas (Brink et al., 1990; Shalaby, 1996; Peña, 2006).

Os resultados médios das análises de espermidina na gema e no albúmen encontram-se na Tab. 26. Para esta amina também não foram observadas diferenças entre as estações do ano e nem entre as mesorregiões do estado de Minas Gerais ($P > 0,05$).

Os ovos coletados na mesorregião do Triângulo Mineiro não apresentaram teores de espermidina em nenhum período estudado. Na região Metropolitana também não foi observada a presença de espermidina na gema

durante as estações seca e chuvosa. Porém, no albúmen esta amina foi encontrada em concentrações acima do limite de quantificação do método. Na mesorregião Sul e Sudoeste, esta amina foi detectada nas estações seca e chuvosa, mas apenas em níveis de traços no albúmen e na gema.

A espermidina foi encontrada tanto no albúmen quanto na gema dos ovos, ao

contrário dos resultados observados por Nishimura et al. (2006), Oliveira et al. (2009), Figueiredo (2012) e Figueiredo et al. (2013) que só detectaram esta amina nas gemas dos ovos. Todas as amostras de gema positivas e a maioria das amostras de albúmen analisadas apresentaram concentrações de espermidina inferiores ao limite de quantificação do método.

Tabela 26. Médias dos teores de espermidina (mg/100g) encontrados no conteúdo interno de ovos produzidos no estado de Minas Gerais

Mesorregião	Estação (mg/100g)			
	Seca		Chuvosa	
	Albúmen	Gema	Albúmen	Gema
Sul e sudoeste	0,012	< LQ	0,014	< LQ
Campo das Vertentes	0,039	< LQ	0,013	< LQ
Oeste de Minas	0,055	< LQ	0,033	ND
Metropolitana	0,024	ND	0,023	ND
Triângulo Mineiro	ND	ND	ND	ND

ND: não detectado (<0,03mg/100g de albúmen e <0,02mg/100g de gema). LQ: Limite de Quantificação (0,07 mg/100g).

Os valores de espermidina encontrados foram inferiores aos verificados por Nishimura et al. (2006), que detectaram esta amina na concentração de 0,058 mg/100g e Oliveira et al. (2009), que observaram o valor médio de 0,049 mg/100g nas gemas de ovos recém postos. Figueiredo (2012) detectou a concentração inicial de espermidina de 0,074 mg/100g em gemas de ovos armazenados por até 125 dias e Figueiredo et al. (2013) encontraram o valor médio inicial de 0,005 mg/100g e o valor final de 0,102 mg/100g na gema de ovos comerciais armazenados por 28 dias.

A espermina não foi observada, tanto na gema quanto no albúmen dos ovos, em

nenhuma mesorregião e em nenhuma estação do ano, com exceção da mesorregião Sul e Sudoeste que apresentou esta amina em concentração superior ao limite de quantificação do método, durante a estação seca.

Ao contrário dos resultados obtidos no presente trabalho, Bardócz et al. (1995) encontraram em ovos cozidos teores de espermina entre 0,02 e 0,06 mg/100g. Okamoto et al. (1997) observaram baixos teores (0,1 mg/100g) desta amina em ovos *in natura* e cozidos. Lima et al. (2006) avaliaram a presença desta amina em ovos comercializados em supermercados e detectaram a concentração de 0,076 mg/100g na gema, enquanto no albúmen foram

encontrados 0,093 mg/100g. Figueiredo (2012) detectou espermina na concentração média inicial de 0,074 mg/100g em gemas de ovos armazenados por 125 dias e no albúmen foram encontrados valores inferiores ao limite de quantificação do método de 0,1 mg/100g.

As aminas naturais espermina e espermidina são formadas *in situ* nas células, além de serem disponibilizadas por meio da ingestão de alimentos (Shalaby, 1996; Lima e Glória, 1999). Estas aminas são importantes no crescimento do organismo, pois participam da proliferação celular regulando a função de ácidos nucleicos e na síntese de proteínas e, dessa forma, a ingestão das mesmas na dieta é desejável, principalmente na recuperação de pacientes acamados (Kalač, 2006). Porém, há evidências que na presença de nitrito e ácidos, a espermidina e, possivelmente a espermina podem levar a formação de nitrosaminas em alimentos. Os níveis dessas aminas encontrados, tanto na gema quanto no albúmen dos ovos, foram baixos e não oferecem riscos à saúde do consumidor. Além disso, pode-se verificar que os ovos não representam uma fonte significativa dessas aminas na dieta.

Uma das vias de formação de aminas nos alimentos é pela reação de descarboxilação de aminoácidos, conduzida por descarboxilases bacterianas. Considerando esta afirmação, para a formação de aminas, deverá haver prévia contaminação bacteriana. Lima e Glória, (1999) relatam que bactérias representantes da

família Enterobacteriaceae, particularmente os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus* assim como dos gêneros *Pseudomonas* e *Streptococcus* são produtoras de aminas. As barreiras naturais de proteção do ovo contra a contaminação microbiana justificam os baixos teores de aminas encontrados tanto na gema quanto no albúmen dos ovos. A casca é a primeira barreira física de proteção do ovo contra a invasão por micro-organismos, além das membranas da casca e do próprio albúmen, que funciona tanto como barreira física devido à sua viscosidade, quanto química, devido às enzimas com atividade antimicrobiana. Desta maneira considerando que os ovos analisados neste experimento eram frescos, recém-coletados, e apresentavam-se em boas condições, os baixos índices de aminas bioativas encontrados no conteúdo interno dos ovos analisados poderiam ser justificados.

Segundo Palencia et al. (2011), alterações nas concentrações fisiológicas de aminas bioativas têm sido correlacionadas a várias desordens, tais como alergias, Síndrome de Parkinson e enxaquecas.

Dessa maneira, devido ao impacto à saúde pública que algumas aminas podem causar, as autoridades de fiscalização devem instituir programas de investigação e pesquisa para que sejam determinados os limites máximos toleráveis por alimento, considerando-se uma dieta saudável e variada, uma vez que as concentrações das aminas presentes em diferentes tipos de

alimentos podem ser somatizadas e que, algumas patologias como a hipertensão e a enxaqueca podem estar sendo alimentadas pelo desconhecimento destes limites por parte dos órgãos regulatórios. Mais pesquisas a este respeito devem ser realizadas, para se identificar qual a verdadeira contribuição destas aminas para distúrbios do sistema cardiovascular, trato gastrointestinal, sistema nervoso central e, principalmente, para os diversos tipos de câncer que atingem a população.

5. CONCLUSÃO

O método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por pareamento de íons em coluna de fase reversa e detecção ultravioleta (UV) após derivação pré-coluna com cloreto de dansila foi validado, sendo adequada sua utilização para determinação de aminas bioativas em carne de peito de frango e nas gemas e albumens de ovos.

Levando-se em consideração o critério aminas bioativas, os produtos de origem avícola, produzidos e comercializados no estado de Minas Gerais, apresentam boa qualidade, uma vez que os níveis de aminas encontrados foram baixos. Além disso, o frango em particular, é uma fonte importante de poliaminas na dieta, em especial, espermidina e espermina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. *Guia para*

validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003.

BALAMATSIA, C. C.; PAEOLOGOS, E. K.; KONTOMINAS, M. G.; SAVVAIDIS, I. N. Correlation between microbial flora, sensory changes and biogenic amines formation in fresh chicken meat stored aerobically or under modified atmosphere packaging at 4°C: possible role of biogenic amines in spoilage indicators. *Antonie van Leewenhoek*, 89, p. 9-17, 2006.

BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; RALPH, A.; PUSZTAI, A. Polyamines in food: implications for growth and health. *J Nutr Biochem*, 4: 66-71; 1993.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 6, p. 341-346, 1995.

BASTON, O.; BARNA, O.; VASILE, A. Microbiota and biogenic amines variation of chicken meat; comparison between white and red meat. *Annals of Food Science and Technology*, v.11, issue 1, 2010.

BOVER-CID, S.; HERNANDEZ-JOVER, T.; MIGUELEZ-ARRIZADO, M. J.; VIDAL-CAROU, M. C. Contribution of contaminant enterobacteria and lactic acid bacteria to biogenic amine accumulation in spontaneous fermentation of pork sausages. *European Food Research and Technology*, 216, 477-482, 2003.

BOVER-CID, S.; MIGUELEZ-ARRIZADO, M. J.; BECKER, B.;

- HOLZAPFEL, W. H.; VIDAL-CAROU, M. C. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*, 25, 269–277, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº185 de 13 de maio de 1997. Aprova Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1997. Disponível: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso: 02 out 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. *Instrução Normativa nº 25, de 2 de junho de 2011. Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para Controle de Pescado e seus Derivados*. Brasília, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Acesso em 12 de janeiro de 2013.
- BRINK, B. T.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H. M. L. J.; VELD, J. H. J. H. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 11, p. 73-84, 1990.
- BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. J.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, v. 13, p. 129-146, 2003.
- BUŇKOVA, L.; BUŇKA, F.; KLČOVSKA, P.; MRKVIŇKA, V.; DOLEŽALOVA, M.; KRAČMAR, S. Formation of biogenic amines by Gram-negative bacteria isolated from poultry skin. *Food Chemistry*, 121; 203–206, 2010.
- CIPOLLA, B. G.; HAVOUI, R.; MOULINOX, J. P. Polyamine contents in current foods: a basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in prostate carcinoma patients. *Amino Acids*. v. 33, p.203–212, 2007.
- CODEX ALIMENTARIUS. Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. CAC/GL 71-2009, p.38, 2009.
- COUTTS, R. T.; BAKER, G. B.; PASUTTO, F. M. Foodstuffs as sources of psychoactive amines and their precursors: Content, significance and identification. *Adv. Drug Res.* v. 15, p.169 - 231, 1986.
- DEL RIO, E.; PANIZO-MORAN, M.; PRIETO, M.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *Int. J. of Food Microbiol.*, 115, 268–280, 2007.
- DUFLOS, G.; DERVIN, C.; MALLE, P.; BOUQUELET, S. Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus*

merlangus). *J. AOAC Int.*, v. 82, p.1097-1101, 1999.

EC - COMISSÃO das Comunidades Europeias. Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao disposto na Directiva 2002/657/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 221, p. 8-36, 2002. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2002/l_221/l_22120020817pt00080036.pdf>. Acesso em 10 de janeiro de 2013.

EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation. Teddington: LGC, 1998, 62p.

FIGUEIREDO, T.C. *Influência das condições e do período de armazenamento nas características físico-químicas, microbiológicas e nos níveis de aminas bioativas em ovos para exportação*. 2012. 113f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FIGUEIREDO, T. C.; VIEGAS, R. P.; LARA, L. J. C.; BAIÃO, N. C.; SOUZA; M. R.; HENEINE, L. G. D.; CANÇADO S. V. Bioactive amines and internal quality of commercial eggs. *Poult. Sci.*, v. 92, p. 1376-1384, 2013.

GALLAS, L.; STANDAROVÁ, E.; STEINHAUSEROVÁ, I.; STEINHAUSER, L.; VORLOVÁ, L. Formation of Biogenic Amines in Chicken Meat Stored under Modified

Atmosphere. *Acta Vet. Brno*, 79, 107–116, 2010.

GEOMARAS, I.; DYKES, G. A.; VON HOLY, A. Biogenic amine formation by poultry-associated spoilage and pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 164–166, 1995.

GLÓRIA, M. B. A. Amines. In: HUI, H.; NOLLET, L. L. *Handbook of Food Science*. New York: Marcel Dekker, 2005. Cap.13. 38p.

GLÓRIA, M.B.A.; VIEIRA, S.M. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. *Food*, v. 1, p. 258-270, 2007.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 5, p. 42-49, 1994.

ICH, International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org>> Acesso em: 05 de dezembro de 2011.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specification for Foods. Microorganisms in foods 6 (2nd ed.). New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2005.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2010. Orientações sobre validação de métodos analíticos. DOQ-

- CGCRE-008. Revisão: 04, julho/2011, p.20, 2011.
- INNOCENTE, N.; BIASUTTI, M.; PADOVESE, M.; MORET, S. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract *Food Chemistry*, v. 101, p. 1285-1289, 2007.
- JEEVANANDAM, M.; PETERSEM, S.R. Clinical role of polyamine analysis: problem and promise. *Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 4, p. 385-390, 2001.
- JONES, D. R.; CURTIS, P. A.; ANDERSON, K. E.; JONES F. T. *Microbial contamination in inoculated shell eggs: II. Effects of layer strain and egg storage*. *Poult. Sci.*, v. 83, p. 95-100, 2004.
- KALÁČ, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chem.*, v. 90, p. 219-230, 2005.
- KALÁČ, P. Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: A review. *Meat Sci.*, v. 73, p. 1-11, 2006.
- KOZOVÁ, M.; KALÁČ, P.; PELIKÁNOVÁ, T. Contents of biologically active polyamines in chicken meat, liver, heart and skin after slaughter and their changes during meat storage and cooking. *Food Chemistry*, 116, p. 419-425, 2009.
- LANÇAS, F. M. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos, SP: RiMa, 2004. p. 62.
- LARQUÉ, E.; MOLINA, M. S.; ZAMORA, S. M. D. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, v. 23, p. 87-95, 2007.
- LÁZARO, C. A.; CONTE-JÚNIOR, C. A.; CUNHA, F. L.; MÁRSICO, E. T.; MANO, S. B.; FRANCO, R. M. Validation of an HPLC Methodology for the Identification and Quantification of Biogenic Amines in Chicken Meat. *Food Anal. Methods*, v. 6, p. 1024-1032, 2013.
- LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* 58: 1-2, 1-37, 2000.
- LIMA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A. Aminas bioativas em alimentos. *Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 33, n. 1, p. 70-79, 1999.
- LIMA, G. P. P.; ROCHA, S. A.; TAKAKI, M.; RAMOS, P. R. R. R. Teores de poliaminas em alguns alimentos da dieta básica do povo brasileiro. *Ciênc. Rural*, v. 36, n. 4, p. 1294-1298, 2006.
- LORET, S.; DELOYER, P.; DANDRIFOSSE, G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. *Food Chemistry*, v. 89, n. 04, p. 519-525, 2005
- MAGA, J. A. Amines in foods. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.*, 10(4):373-403, 1978.

- MAIJALA, R. L.; EEROLA, S. H.; AHO, M. A.; HIRN, J. A. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection* 56:125-129, 1993.
- MALLE, P.; VALLE, M.; BOUQUELET, S. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC Int.*, v.79, p.43-49, 1996.
- MIN, J. S., LEE, S. O., JANG, A., LEE, M.; KIM, Y. Production of biogenic amines by microflora inoculated in meats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17, 1472-1478, 2004.
- MIN, J. S.; LEE, S. O.; JANG, A.; JO, C.; LEE, M. Control of microorganisms and reduction of biogenic amines in chicken breast and thigh by irradiation and organic acids. *Poult. Sci.*, v. 86, p. 2034-2041, 2007.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.*, v. 24, p.184-197, 2005.
- MOREIRA, A. P. S.; GIOMBELLI, A., LABANCA, R. A., NELSON, D. L., & GLORIA, M. B. A. Effect of aging on bioactive amines, microbial flora, physico-chemical characteristics, and tenderness of broiler breast meat. *Poult. Sci.*, 87, 1868-1873, 2008.
- MOUDGAL, R. P.; PANDA, J. N.; MOHAN, J. Histamine in egg yolk: heat resistance and relation to production status. *Brit. Poult. Sci.*, v. 32, p. 865-869, 1991.
- NASSAR, A. M.; EMAM, W. H. Biogenic amines in chicken meat products in relation to bacterial load, pH value and sodium chloride content. *Nahrung/Food*, 46, n° 3, p. 197-199, 2002.
- NISHIMURA, K.; SHIINA, R.; KASHIWAGI, K.; IGARASHIY, K. Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *J. Biochem.* v. 139, p. 81-90, 2006.
- NYCHAS, G.-J. E.; SKANDAMIS, P. N.; TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K. P. Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78, 77-89, 2008.
- OKAMOTO, A.; SUGI, E.; KOIZUMI, Y.; YANAGIDA, F.; UDAKA, S. Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Biosci., Biotechnol. Biochem.*, v. 61, n. 9, p. 1582-1584, 1997.
- OLIVEIRA, G. E.; FIGUEIREDO, T. C.; SOUZA, M. R., et al. Bioactive amines and quality of egg from Dekalb hens under different storage conditions. *Poult. Sci.* v.88, p.2428-2434, 2009.
- OZOGUL, F.; OZOGUL, Y. The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology*, 225, 385-394, 2007.
- PALENCIA, P. F.; FERNÁNDEZ, M.; MOHEDANO, M. L.; LADERO, V.; QUEVEDO, C.; ALVAREZ, M. A.; LOPEZ, P. Role of tyramine synthesis by food-borne *Enterococcus durans* in adaptation to the gastrointestinal tract

environment. *Applied and Environmental Microbiology* v. 77(2), p. 699-702, 2011.

PATSIAS, A.; CHOULIARA, I.; PALEOLOGOS, E. K.; SAVVAIDIS, I.; KONTOMINAS, M. G. Relation of biogenic amines to microbial and sensory changes of precooked chicken meat stored aerobically and under modified atmosphere packaging at 4 °C. *European Food Research and Technology*, 223, 683–689, 2006.

PEÑA, C. V. M. *Histamina e tiramina em produtos cárneos*. Santa Maria, 2006. 84 f. (Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

PIRCHER, A.; BAUER, F.; PAULSEN, P. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*, 226, 225–231, 2007.

RAMOS, B.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Changes of yolk biogenic amine concentrations during storage of shell hen eggs. *Food Chem.*, v. 116, p. 340-344, 2009.

RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. Validation of chromatographic methods: evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *J Chromatogr.*, v. 1156, p. 201-205, 2007.

SAITO, K.; HORIE, M.; NOSE, N.; NAKAGOMI, K.; NAKAZAWA, H.

Determination of polyamines in foods by liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. *Analyt. Sci.*, v. 8, p. 675-680, 1992.

SALAZAR, M. T.; SMITH, T. K.; HARRIS, A. High-performance liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in feedstuffs, complete feeds, and animal tissues. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 1708-1712, 2000.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 308 p, 2002

SEILER, N. Catabolism of polyamines. *Amino Acids*, v. 26, p.217-233, 2004.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.*, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 29, p. 213-231, 1996.

SILLA-SANTOS, M. H. Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 39, p. 227-230, 1998.

SILVA, C. M. G.; GLORIA, M. B. A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 °C and in chicken-based meat products. *Food Chemistry*, v. 78, p. 241-248, 2002.

SMITH, T. A. Amines in food. *Food Chem.*, v. 6, p. 169-200, 1980-81.

SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimento*. Belo Horizonte, 2007. 297 f. (Tese de Doutorado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TAMIM, N. M.; DOERR, J. A. Effect of putrefaction of poultry carcasses prior to rendering on biogenic amine production. *Journal of Applied Poultry Research*, 12, 456-460, 2003.

THERON, H.; VENTER, P.; LUES, J. F. R. Bacterial growth on chicken eggs in various storage environments. *Food Res. Int.*, v36, p. 969-975. 2003.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *J. Pure Appl. Chem.*, v. 74, n. 5, p. 835- 855, 2002.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Relatórios Anuais. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_relatoriosanuais.php> Acesso em 10 novembro de 2013.

VECIANA-NOGUES, M. T.; MARINE-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *J. Agric. Food Chem.* 45:2036-2041, 1997.