

FLÁVIA BEATRIZ CUSTÓDIO

**EFICIÊNCIA E SELETIVIDADE DE DIFERENTES
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E
DETECÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA EM QUEIJO
RALADO**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2006

FLÁVIA BEATRIZ CUSTÓDIO

**EFICIÊNCIA E SELETIVIDADE DE DIFERENTES
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E
DETECÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA EM QUEIJO
RALADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2006

C987e Custódio, Flávia Beatriz.
Eficiência e seletividade de diferentes métodos de extração,
purificação e detecção de histamina e tiramina em queijo ralado /
Flávia Beatriz Custódio. – 2006.
160 f. : il.

Orientadora: Profª Dra. Maria Beatriz Abreu Glória.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos.

1. Alimentos – Análise – Teses. 2. Alimentos – Contaminação –
Teses. 3. Aminas – Teses. 4. Espectrofotometria de absorção
molecular – Teses. 5. Queijo ralado – Qualidade – Teses. I. Glória,
Maria Beatriz Abreu. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Farmácia.

CDD: 637.7

FLÁVIA BEATRIZ CUSTÓDIO

**“EFICIÊNCIA E SELETIVIDADE DA EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETECÇÃO DE
HISTAMINA E TIRAMINA EM QUEIJO RALADO”**

TESE APROVADA EM 26 DE SETEMBRO DE 2006

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. HELENA TEIXEIRA GODOY

Profa. Dra. ZENILDA DE LOURDES CARDEAL

Prof. Dr. ROBSON JOSÉ DE CÁSSIA FRANCO AFONSO

Prof. Dr. FERNÃO CASTRO BRAGA

Profa. Dra. MARIA BEATRIZ ABREU GLÓRIA

Orientadora

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Beatriz Abreu Glória pelo conhecimento, oportunidades de aprendizado e incentivo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao professor José Virgílio Coelho pela disponibilidade e por ajudar sempre que requisitado.

Ao professor David Lee Nelson pelas sugestões dadas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia pelo aprendizado.

Às funcionárias da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pela atenção, dedicação e auxílio.

Às alunas de iniciação científica Ana Paula Fernandes Cherubino e Suzane Marques pela disposição e valiosa contribuição com o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos pelas contribuições com este trabalho e amizade: Ana Amélia P. Almeida, Ana Paula S. Moreira, Beatriz Depes T. Netto, Bruna A. P. Mendes, Bruno, Cristina C. Naghetini, Cyntia, Elisângela Flávia Pimentel, Érico Tavares, Fernanda, Flávia R. Gonçalves, Flávia Vitorino, Giuliana E. Oliveira, Igor, João Tavares Neto, Karine H. Theodoro, Leonardo L. Rocha, Lúcia Peret de Almeida, Márcia Cassimira, Marcos C. Lage, Maria Cristina C. de Oliveira, Milton C. de Vasconcelos Neto, Patrícia R. L. Saraiva, Paula S. Silva, Raquel M. Dinis, Regilda, Renata A. Labanca, Sílvia Mendonça Vieira, Tânia M. L. Oliveira, Tarliane M. da Silva, Tássia, Vilma Vieira Silva.

A todos os colegas da Pós-graduação em Ciência de Alimentos, em especial a Carol Lílian Coelho e Lígia Lindner Schreiner.

Aos colegas do Instituto Mineiro de Agropecuária pelo incentivo e apoio.

A todos os meus amigos, em especial a Anna Letícia Soares, Alice R. Camoropins, Aline R. Camoropins, Ana Cecília R. Camoropins e Flávia Fontes Faria.

À minha mãe e irmãs pelo suporte e carinho.

Ao Fabrízio pelo apoio, paciência e carinho.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho chegasse ao fim.

Muito obrigada!

“A natureza é recatada: não expõe os seus segredos nos dados que dela colhemos; diz uma coisa, mas quer significar outra. Podemos lentamente ir desvendando a sua nudez, arrancando-lhe, pouco a pouco, os densos véus que a recobrem. Mas, quanto mais véus retiramos, mais véus encontramos à nossa espera. A nossa ‘arte’ não consiste em colocar o manto diáfano da fantasia sobre a nudez forte da verdade. Pelo contrário, a nossa ‘arte’ consiste em arrancar, um a um, os densos véus da realidade aparente que recobrem a inatingível realidade em si.”

Newton FREIRE-MAIA

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	16
RESUMO	18
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO	20
REVISÃO DA LITERATURA	23
1 AMINAS BIOATIVAS	23
1.1 DEFINIÇÃO, ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO	23
1.2 FORMAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS	24
1.3 ASPECTOS FUNCIONAIS E TOXICOLÓGICOS	29
1.4 AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJOS	32
2 QUEIJO RALADO	34
3 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE AMINAS	36
3.1 EXTRAÇÃO	37
3.2 PURIFICAÇÃO	38
3.2.1 Extração líquido-líquido	39
3.2.2 Purificação por extração em fase sólida	41
3.3 DETECÇÃO DE AMINAS	43
3.4 SEPARAÇÃO E ANÁLISE DE AMINAS	47
3.4.1 Cromatografia de troca iônica	48
3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	49
CAPÍTULO I – PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJO RALADO	51
RESUMO	51
1 OBJETIVOS	52
2 MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1 MATERIAL	52
2.1.1 Amostras	52
2.1.2 Reagentes e solventes	52
2.1.3 Preparo da solução padrão de aminas	53
2.2 MÉTODOS DE ANÁLISE	53
2.2.1 Extração das aminas bioativas	53
2.2.2 Separação e determinação de aminas bioativas por CLAE com par iônico	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1 PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJOS RALADOS	55
3.2 COMPARAÇÃO DOS TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJOS RALADO PRODUZIDOS EM DIFERENTES PERÍODOS	59
3.3 CORRELAÇÃO DOS TEORES DE HISTAMINA E TIRAMINA COM AMINAS BIOGÊNICAS	61

4	CONCLUSÕES	62
CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA EM QUEIJO PARMESÃO RALADO		63
	RESUMO	63
1	OBJETIVOS	64
2	MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1	MATERIAL	64
2.1.1	Amostras	64
2.1.2	Reagentes e solventes	65
2.1.3	Preparo da solução padrão de aminas	65
2.2	MÉTODOS	65
2.2.1	Otimização dos métodos de extração de aminas bioativas de queijo ralado	65
2.2.1.1	<i>Influência da concentração do ácido clorídrico na extração de aminas bioativas em queijo parmesão ralado</i>	66
2.2.1.2	<i>Influência da extração sucessiva com ácido sulfosalicílico na recuperação de aminas bioativas em queijo parmesão ralado</i>	66
2.2.1.3	<i>Influência da extração metanólica nos teores de aminas bioativas em queijo parmesão ralado</i>	67
2.2.1.4	<i>Influência da temperatura do etanol na extração de aminas bioativas em queijo parmesão ralado</i>	67
2.2.2	Comparação da eficiência de diferentes procedimentos de extração na recuperação de aminas bioativas	68
2.2.2.1	<i>Extração em meio ácido e básico</i>	68
2.2.2.2	<i>Extração com solvente orgânico</i>	68
2.3	MÉTODOS DE ANÁLISE	69
2.3.1	Separação e determinação de aminas bioativas por CLAE com par iônico	69
2.3.2	Análise estatística	69
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1	OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA E OITO AMINAS INTERFERENTES DE QUEIJO PARMESÃO RALADO	69
3.1.1	Influência da concentração do ácido clorídrico	69
3.1.2	Influência da extração sucessiva com ácido sulfosalicílico	71
3.1.3	Influência do método de extração metanólica	72
3.1.4	Influência da temperatura do etanol	73
3.2	INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE HISTAMINA TIRAMINA E OITO AMINAS INTERFERENTES DE QUEIJO RALADO.....	74
3.2.1	Influência da concentração da amina na matriz na recuperação durante a extração ...	74
3.2.2	Influência do tipo de solvente na extração de aminas	76
4	CONCLUSÕES	78

CAPÍTULO III – OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE DERIVAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA COM NINIDRINA E CLORETO DE DANSILA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO NA ANÁLISE DESSAS AMINAS SEM INTERFERÊNCIA		80
	RESUMO	80
1	OBJETIVOS	81
2	MATERIAL E MÉTODOS	81

2.1	MATERIAL	81
2.1.1	Reagentes e solventes	81
2.1.2	Preparo da solução padrão de aminas	81
2.1.2	Soluções tampão	82
2.2	MÉTODOS	82
2.2.1	Absorção de histamina e tiramina sem derivação na região do ultravioleta	82
2.2.2	Reação da histamina e tiramina com ninidrina	83
2.2.2.1	<i>Avaliação do meio que ocorre a reação das aminas com ninidrina</i>	83
2.2.2.2	<i>Determinação do pH ideal para a reação de histamina e tiramina com ninidrina</i>	84
2.2.2.3	<i>Determinação do tempo de aquecimento e da concentração do derivante ideais para a reação de histamina e tiramina com ninidrina</i>	84
2.2.2.4	<i>Determinação da temperatura de aquecimento ideal para a reação de histamina e tiramina com ninidrina</i>	84
2.2.2.5	<i>Avaliação da interferência de oito aminas bioativas no espectro dos derivados da histamina e da tiramina com ninidrina</i>	85
2.2.2.6	<i>Avaliação da estabilidade dos derivados de histamina e tiramina com ninidrina</i>	85
2.2.2.7	<i>Curva analítica dos derivados da histamina e tiramina com ninidrina</i>	85
2.2.3	Reação de histamina e tiramina com cloreto de dansila	85
2.2.3.1	<i>Influência do solvente na derivação de histamina e tiramina com DnsCl</i>	86
2.2.3.2	<i>Influência da adição de NH₄OH após a reação de histamina e tiramina com DnsCl</i>	86
2.2.3.3	<i>Determinação do tempo e temperatura de aquecimento ideais para a reação de histamina e tiramina com DnsCl</i>	87
2.2.3.4	<i>Avaliação da interferência de oito aminas bioativas no espectro dos derivados da histamina e da tiramina com DnsCl</i>	87
2.2.3.5	<i>Avaliação da estabilidade dos derivados de histamina e tiramina com DnsCl na ausência e na presença de luz</i>	87
2.2.3.6	<i>Curva analítica dos derivados da histamina e tiramina com DnsCl</i>	87
2.2.4	Análise dos dados	88
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
3.1	DETECÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA SEM DERIVAÇÃO NO ULTRAVIOLETA	88
3.2	DERIVAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA COM NINIDRINA	89
3.2.1	Avaliação do meio que ocorre a reação das aminas com ninidrina	89
3.2.2	Determinação do pH ideal para a reação de histamina e tiramina com ninidrina	90
3.2.3	Determinação do tempo e temperatura de aquecimento ideais e da influência da concentração de ninidrina na reação com histamina e tiramina	91
3.2.4	Avaliação da interferência de oito aminas bioativas no espectro dos derivados da histamina e da tiramina com ninidrina	92
3.2.5	Avaliação da estabilidade dos derivados de histamina e tiramina com ninidrina	95
3.2.6	Curva analítica dos derivados da histamina e tiramina com ninidrina	96
3.3	DERIVAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA COM CLORETO DE DANSILA	97
3.3.1	Influência do solvente na derivação de histamina e tiramina com DnsCl	97
3.3.2	Influência da adição de NH ₄ OH após a reação de histamina e tiramina com DnsCl	97
3.3.3	Determinação do tempo e temperatura de aquecimento ideais para a reação de histamina e tiramina com DnsCl	98
3.3.4	Avaliação da interferência de oito aminas bioativas no espectro dos derivados da histamina e da tiramina com DnsCl	99
3.3.5	Avaliação da estabilidade dos derivados de histamina e tiramina com DnsCl na ausência e na presença de luz	100
3.2.6	Curva analítica dos derivados da histamina e tiramina com DnsCl	101

4	CONCLUSÕES	102
CAPÍTULO IV – AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS NA PURIFICAÇÃO POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE HISTAMINA E TIRAMINA EM EXTRATOS DE QUEIJO PARMESÃO RALADO		
	RESUMO	104
1	OBJETIVOS	105
2	MATERIAL E MÉTODOS	105
2.1	MATERIAL	105
2.1.1	Amostras	105
2.1.2	Reagentes e solventes	106
2.2	MÉTODOS	106
2.2.1	Influência do tipo de extrato na purificação por extração líquido-líquido	106
2.2.1.1	<i>Extração ácida e alcalina</i>	106
2.2.1.2	<i>Extração líquido-líquido</i>	106
2.2.2	Comparação da eficiência e seletividade da extração líquido-líquido de extratos de queijo parmesão ralado com quatro solventes em diferentes valores de pH	107
2.2.3	Comparação da purificação de aminas com éter etílico por extração líquido-líquido sem e com suporte sólido	108
2.3	MÉTODOS DE ANÁLISE	108
2.3.1	Separação e determinação de aminas bioativas por CLAE com par iônico	108
2.3.2	Análise estatística	109
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
3.1	INFLUÊNCIA DA EXTRAÇÃO ÁCIDA E ALCALINA DE QUEIJO PARMESÃO RALADO NA PURIFICAÇÃO DE AMINAS POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO UTILIZANDO QUATRO SOLVENTES DIFERENTES	109
3.2	INFLUÊNCIA DO pH NA EFICIÊNCIA DE PURIFICAÇÃO DE AMINAS POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	111
3.3	COMPARAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM ÉTER ETÍLICO SEM E COM SUPORTE SÓLIDO	113
4	CONCLUSÕES	114
CAPÍTULO V – AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE AMINAS BIOATIVAS E AMINOÁCIDOS		
	RESUMO	115
1	OBJETIVOS	116
2	MATERIAL E MÉTODOS	116
2.1	MATERIAL	116
2.1.1	Amostras	116
2.1.2	Reagentes e solventes	117
2.1.3	Preparo da solução padrão de aminas	117
2.1.4	Obtenção dos extratos de queijo Parmesão ralado.....	118
2.2	MÉTODOS	118
2.2.1	Eficiência do SEP-PAK C ₁₈ na purificação de extratos ácido e etanólico de queijo Parmesão ralado.....	118
2.2.2	Purificação de extrato de queijo Parmesão ralado com bentonite	118
2.2.2.1	<i>Otimização da purificação de histamina e tiramina de extrato de queijo parmesão ralado com bentonite</i>	118

a	<i>Influência da massa de bentonite utilizada</i>	118
b	<i>Influência do tempo de agitação</i>	119
2.2.3	Purificação de aminas bioativas por troca aniônica	119
2.2.3.1	<i>Perfil de eluição e retenção das aminas bioativas e aminoácidos</i>	119
2.2.3.2	<i>Influência do volume de água de lavagem na eluição das aminas bioativas</i>	120
2.2.3.3	<i>Influência do tamanho da malha da resina e o número de ligações entre os grupos de poliestireno na eluição das aminas bioativas</i>	120
2.2.3.4	<i>Eluição da histamina, da tiramina, dos aminoácidos e de oito aminas</i>	121
2.2.4	Purificação de aminas bioativas por troca catiônica	121
2.2.4.1	<i>Purificação de aminas em cartuchos de troca iônica</i>	121
2.2.4.2	<i>Teste preliminar de separação da tiramina e da histamina</i>	122
2.2.4.3	<i>Perfil de separação da histamina e tiramina na presença de oito aminas bioativas e aminoácidos</i>	122
2.3	MÉTODOS DE ANÁLISE	123
2.3.1	Separção e determinação de aminas bioativas por CLAE	123
2.3.2	Análise estatística	124
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
3.1	PURIFICAÇÃO DE HISTAMINA, TIRAMINA E OITO AMINAS COM SEP-PAK C ₁₈	124
3.2	PURIFICAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA COM BENTONITE	125
3.2.1	Estudo da influência da proporção de bentonite utilizada	125
3.2.2	Estudo da influência do tempo de contato da amostra sob agitação com bentonite.....	126
3.3	PURIFICAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS POR TROCA ANIÔNICA	128
3.3.1	Perfil de retenção e eluição de histamina, tiramina, oito aminas bioativas e aminoácidos por resinas de troca aniônica	128
3.3.2	Influência do volume de água de lavagem na retenção das aminas bioativas	130
3.3.3	Influência do tamanho da malha da resina e do número de ligações entre os grupos de poliestireno na retenção das aminas bioativas	131
3.3.4	Eluição das aminas retidas e dos aminoácidos	132
3.4	PURIFICAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA POR TROCA CATIÔNICA	134
3.4.1	Purificação de histamina e tiramina em cartuchos de troca iônica	134
3.4.2	Teste preliminar de separação de histamina e tiramina.....	134
3.4.3	Perfil de separação de histamina e tiramina na presença de oito aminas bioativas e aminoácidos.....	135
4	CONCLUSÕES	138
	CONCLUSÕES INTEGRADAS E SUGESTÕES	139
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
	APÊNDICE A	157
	APÊNDICE B	160

LISTA DE TABELAS

1	Características físico-químicas de algumas aminas bioativas presentes em alimentos	25
2	Teores de aminas bioativas em queijos	33
I.1	Teores de aminas bioativas em queijo parmesão ralado, queijo tipo parmesão ralado e queijo ralado	56
I.2	Correlação entre os teores de tiramina, histamina, aminas totais e aminas biogênicas	61
II.1	Recuperação média de aminas bioativas extraídas de queijo parmesão ralado adicionado de padrão em dois níveis de concentração (5,0 e 10,0 mg/100g) com duas concentrações HCl	70
II.2	Influência do número de extrações sucessivas com ácido sulfosalicílico 12,0 g/100 mL nos teores de aminas bioativas de queijo parmesão ralado	71
II.3	Teores de aminas bioativas obtidas pela extração de queijo parmesão ralado com metanol utilizando diferentes procedimentos	72
II.4	Influência da temperatura do etanol na extração de aminas bioativas em queijo parmesão ralado	74
II.5	Influência do tipo de solvente extrator na recuperação de aminas bioativas de amostras de queijo parmesão ralado adicionadas de duas concentrações (5,0 e 10,0 mg/100g) de aminas	75
II.6	Aminas bioativas que atenderam as recomendações do <i>Codex</i> com consideração na porcentagem de recuperação e no coeficiente de variação durante a extração com diferentes extratores	77
III.1	Preparo de soluções tampão fosfato em diferentes valores de pH	82
III.2	Preparo de soluções tampão borato em diferentes valores de pH	82
III.3	Influência do pH na formação dos derivados da histamina e da tiramina com ninidrina	90
III.4	Influência da concentração de ninidrina adicionada e do tempo de aquecimento na formação dos derivados da histamina e da tiramina com leitura da absorvância a 568 e 402 nm	91

III.5	Influência da temperatura de aquecimento durante 20 min na formação dos derivados da histamina e da tiramina com ninidrina com leitura da absorvância a 568 e 402 nm	92
III.6	Rendimento da derivação das aminas bioativas com ninidrina, calculado pela absorvância molar, obtida pela Lei de Beer	94
III.7	Absorvância da histamina e da tiramina a 568 e 402 nm, em diferentes concentrações, imediatamente, 45 e 100 min após reação com ninidrina	95
III.8	Absorvância da histamina e da tiramina a 372 nm, após reação com cloreto de dansila sem e com adição de NH ₄ OH em diferentes condições	97
III.9	Influência do tempo e da temperatura de aquecimento na formação dos derivados da histamina e da tiramina com cloreto de dansila com leitura da absorvância a 372 nm	98
III.10	Absorvância molar em 372 nm, calculada pela Lei de Beer, das aminas bioativas derivadas com cloreto de dansila	100
III.11	Absorvância da histamina e da tiramina a 372 nm, após reação com cloreto de dansila na ausência e na presença da luz, avaliada em diversos intervalos de tempo	101
IV.1	Recuperação das aminas bioativas interferentes na determinação de histamina e tiramina de extratos ácido e alcalino de queijo parmesão ralado após extração líquido-líquido com quatro solventes orgânicos	110
IV.2	Recuperação de aminas bioativas após purificação por extração com éter etílico pelo método clássico, em valores de pH 10,0 e 9,0 e pelo método de adsorção em suporte sólido – terra diatomácea em pH 9,4	113
V.1	Recuperação da histamina, tiramina e oito aminas bioativas após purificação dos extratos ácido e etanólico de queijo parmesão ralado com SEP-PAK C ₁₈	125
V.2	Influência da concentração de bentonite, mantida em contato por 60 min, na recuperação média de histamina, tiramina e oito aminas interferentes purificadas de extrato ácido de queijo parmesão ralado, adicionado de padrão em dois níveis de concentração (5,0 e 10,0 mg/100 g)	126
V.3	Influência do tempo de agitação na recuperação de aminas bioativas em extrato ácido de queijo parmesão ralado após purificação com bentonite na proporção de 50,0 mg/mL	127
V.4	Recuperação das aminas bioativas após purificação em resina de troca aniônica Dowex1 - X8, 100 mesh, de acordo com o método descrito por AOAC (1995)	129

V.5	Influência do volume de água de lavagem na recuperação da histamina, tiramina e oito aminos bioativas purificadas de extrato metanólico de queijo parmesão ralado em resina de troca aniônica Dowex 1 X8 - 100, de acordo com o método descrito por AOAC (1995)	130
V.6	Influência do tamanho da malha da resina Dowex1 - X8, na recuperação da histamina, tiramina e oito aminos bioativas após purificação em resina de troca aniônica	131
V.7	Influência do número de ligações entre os grupos de poliestireno na recuperação da histamina, tiramina e oito aminos bioativas após purificação em resina de troca aniônica	132
V.8	Percentuais de recuperação de aminoácidos e aminos bioativas em solução padrão eluídas com soluções ácida e básica da resina Dowex1 - X8, 100 mesh	132
V.9	Concentração encontrada nas frações coletadas de histamina e tiramina eluídas da resina AG® 50W - X8 com diferentes soluções	135
V.10	Perfil da eluição de dez aminos bioativas com diferentes eluentes em resina de troca catiônica	137
V.11	Perfil da eluição de aminoácidos com diferentes eluentes em resina de troca catiônica	137

LISTA DE FIGURAS

1	Estruturas químicas de algumas aminas bioativas	23
2	Vias para a síntese de poliaminas	27
3	Processo de purificação por extração sólido-líquido utilizando Extrelut®	41
4	Estrutura química das principais substâncias utilizadas na derivação de aminas	44
5	Reação da ninidrina com aminas primárias	45
6	Reação do cloreto de dansila aminas primárias	46
7	Reação de <i>orto</i> -ftalaldeído e mercaptoetanol com aminas primárias	46
I.1	Teores totais de aminas bioativas de amostras de queijo ralado coletadas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, no período de março de 2005 a maio de 2006	55
I.2	Teores médios de histamina de amostras de queijo ralado coletadas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, no período de março de 2005 a maio de 2006	57
I.3	Teores médios de tiramina de amostras de queijo ralado coletadas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, no período de março de 2005 a maio de 2006	58
I.4	Teores totais, de histamina e de tiramina de amostras de queijo ralado coletadas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, nos períodos de dezembro de 1999 a maio de 2001 e de março de 2005 a maio de 2006	60
II.1	Recuperação média da histamina, tiramina e aminas bioativas de queijo parmesão ralado durante extração com diferentes solventes	76
III.1	Esquema do procedimento de derivação de aminas bioativas com ninidrina ..	83
III.2	Esquema do procedimento de derivação de aminas bioativas com cloreto de dansila	86

III.3	Espectro de absorção da histamina (a) e tiramina (b) na região do ultravioleta na concentração de 20 µg/mL	88
III.4	Curva analítica da tiramina com leitura da absorvância a 275 nm em concentrações entre 20 a 202 µg/mL	89
III.5	Espectro de absorção, na região do visível, dos derivados da tiramina (a) e histamina (b) com ninidrina na concentração de 40 µg/mL e 55 µg/mL, respectivamente	93
III.6	Espectro de absorção, na região do visível, dos derivados da ninidrina com tiramina e histamina sobrepostos aos espectros de putrescina e cadaverina, espermidina e espermina, agmatina, feniletilamina, triptamina e serotonina ...	93
III.7	Relação entre o rendimento da derivação das aminas bioativas com ninidrina a 568 e 402 nm, calculado pela absorvância molar, obtida pela Lei de Beer .	94
III.8	Curvas analíticas do derivado da histamina com ninidrina em concentrações de 5 a 20 µg/mL com leitura da absorvância a 568 e 402 nm	96
III.9	Curvas analíticas do derivado da tiramina com ninidrina em concentrações de 3 a 20 µg/mL com leitura da absorvância a 568 e 402 nm	96
III.10	Espectro de absorção, na região do uv-visível, dos derivados de tiramina e histamina com dansila sobrepostos aos espectros dos derivados de putrescina e cadaverina, espermidina e espermina, agmatina, feniletilamina, triptamina e serotonina	99
III.11	Curva analítica dos derivados de dansila da histamina, em concentrações de 5 µg/mL a 20 µg/mL, e da tiramina, em concentrações de 3 µg/mL a 20 µg/mL, com leitura da absorvância a 372 nm	102
IV.1	Eficiência da extração líquido-líquido de histamina e tiramina em extratos ácido e alcalino com quatro diferentes solventes orgânicos	110
IV.2	Variação dos valores médios de recuperação das aminas bioativas em função do pH do extrato na extração líquido-líquido com (a) éter etílico; (b) <i>n</i> -butanol; (c) acetato de etila; e (d) clorofórmio.	112
V.1	Perfil cromatográfico de solução contendo dez aminas e três aminoácidos antes (a) e após (b) purificação em resina de troca aniônica Dowex1 - X8, 100 mesh, de acordo com o método descrito por AOAC (1995)	128

- V.2** Perfil cromatográfico do extrato metanólico de queijo parmesão ralado antes (a) e após (b) purificação em resina de troca aniônica Dowex1 - X8, 100 mesh, de acordo com o método descrito por AOAC (1995) 129
- V.3** Perfil cromatográfico do extrato etanólico de queijo parmesão ralado purificado em resina de troca aniônica Dowex1 - X8, 100 mesh e eluído com tampão fosfato em pH 5,5 133
- V.4** Cromatograma da tiramina e histamina em diferentes eluatos obtidos por troca catiônica com resina AG® 50W - X8 e eluição com (a) solução salina 0,7 mol/L; (b) solução salina 0,7 mol/L com 30% de isopropanol; (c) 5 mL e (d) após 40 mL de solução salina 2,0 mol/L tamponada em pH 5,6 136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac: ácido
AcEt: acetato de etila
Alc: alcalino
AGM: agmatina
AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*
ASS: ácido sulfosalicílico
BuOH: *n*-butanol
CAD: cadaverina
CCD: cromatografia de camada delgada
CHCl₃: clorofórmio
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
CV: coeficiente de variação
DAO: diaminoxidase
DnsCl: cloreto de dansila
EE: éter etílico
EPD: espermidina
EPM: espermina
FEM: feniletilamina
FEN: fenilalanina
FMOC: 9-fluorenilmetil cloroformato
HIM: histamina
HIS: histidina
HMT: histamina-N-metiltransferase
MAO: monoaminoxidase
nd: não detectado
OPA: *orto*-ftalaldeído
PAO: poliaminoxidase
PUT: putrescina
QPR: queijo parmesão ralado
QR: queijo ralado
QTPR: queijo tipo parmesão ralado

SRT: serotonina

TCA: ácido tricloroacético

TIM: tiramina

TIR: tirosina

TRM: triptamina

UV: ultravioleta

VIS: visível

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência e a seletividade das etapas de extração, purificação e detecção na determinação de histamina (HIM) e tiramina (TIM) em queijo ralado para utilização de um método simples de análise por espectrofotometria de absorção molecular. A presença e os teores de HIM, TIM e oito aminas (putrescina, cadaverina, agmatina, espermina, espermidina, feniletilamina, serotonina e triptamina) foram determinados em 13 marcas de queijo ralado. Foram detectadas as dez aminas bioativas investigadas, incluindo HIM e TIM em teores de até 78,27 e 34,42 mg/100 g respectivamente. A extração de aminas bioativas foi avaliada com cinco soluções ácidas, tampão borato, metanol e etanol, sendo os procedimentos com HCl e etanol selecionados. Nenhum dos solventes extratores foi seletivo para HIM e TIM. Os derivados da HIM e TIM com ninidrina e cloreto de dansila apresentaram os mesmos perfis de absorção das outras oito aminas encontradas no queijo ralado. Desta forma, estas aminas, juntamente com aminoácidos, podem ser interferentes da análise espectrofotométrica de absorção molecular de histamina e tiramina, sendo necessários procedimentos de purificação para a análise utilizando estes componentes na derivação. A purificação de HIM e TIM por extração líquido-líquido com quatro solventes orgânicos foi avaliada. HIM e TIM apresentaram valores de recuperações adequados na partição com éter etílico em pH 10,0. No entanto, nenhum dos procedimentos foi específico para estas duas aminas. A purificação em fase sólida com SEP-PAK C₁₈, bentonite troca aniônica e catiônica foi avaliada. A purificação com SEP-PAK C₁₈ e bentonite não foi seletiva e não apresentou valores de recuperação adequados para HIM e TIM. Na troca aniônica, TIM, serotonina e os aminoácidos ficaram retidos na resina e não foram eluídas eficientemente. As demais aminas foram eluídas. As aminas bioativas ficaram retidas fortemente na resina de troca catiônica, sendo necessária elevada força iônica para eluição destas. A análise de HIM e TIM separadamente não foi viável nas condições testadas. No entanto, é possível avaliar a análise de aminas biogênicas, exceto TIM, pela sequência de extração com HCl 1,0 mol/L, purificação por troca aniônica, seguida de quantificação por espectrofotometria de absorção molecular após derivação com ninidrina.

Palavras-chave: tiramina; histamina; queijo ralado; extração líquido-líquido; purificação em fase sólida; espectrofotometria de absorção molecular.

ABSTRACT

Efficiency and selectivity of different methods of extraction, purification and detection of histamine and tyramine in grated cheese. The aim of this work was to evaluate the efficiency and selectivity of extraction, purification and detection steps of histamine (HIM) and tyramine (TYM) determination in grated cheese with a simple analysis by molecular absorption spectrophotometry. The profile and levels of HIM, TYM and eight amines (putrescine, cadaverine, agmatine, spermine, spermidine, phenylethylamine, serotonin, tryptamine) were determined in 13 brands of grated cheese. Ten bioactive amines were detected, including HIM and TIM at levels up to 78.27 and 34.42 mg/100 g, respectively. The extraction of bioactive amines was evaluated with five acid solutions, borate buffer, methanol and ethanol, as solvents. HCl 1.0 mol/L and ethanol provided the best results. None of the extractors was selective for HIM and TYM. HIM and TYM derivatized with ninhydrin and dansyl chloride showed the same absorption profile compared to those exhibited by the eight other amines found in grated cheese. Since these amines, as well as amino acids, might show molecular spectrophotometric absorption which would interfere on HIM and TYM quantification, purification procedures are necessary. HIM and TYM purification by liquid-liquid extraction with four organic solvents was evaluated. Appropriate HIM and TYM recoveries were observed with ethyl ether at pH 10.0. However none of the procedures was specific for these amines. Solid phase extraction with SEP-PAK C₁₈, bentonite, anion and cation exchange were evaluated. SEP-PAK C₁₈ and bentonite purification were not selective and provided inappropriate recoveries for HIM and TYM. When using anion exchange, TIM, serotonin and amino acids were strongly retained and did not elute efficiently. The bioactive amines were strongly retained on the cation exchange resin, and high ionic strength was necessary to elute them. Selective HIM and TYM analysis was not viable in the evaluated conditions. However, it is possible to evaluate biogenic amines, except TYM, by HCl 1.0 mol/L extraction, anion exchange purification and quantification by molecular absorption with ninhydrin derivatization.

Key-words: histamine; tyramine; grated cheese; liquid-liquid extraction; solid phase extraction; spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

Aminas biogênicas são bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas de baixo peso molecular que são formadas durante os processos metabólicos secundários em plantas, animais e microrganismos. Dentre elas, estão histamina e tiramina que podem ser encontradas em vários alimentos e bebidas, cuja elaboração inclui processos de maturação ou fermentação. A formação das aminas biogênicas é resultante principalmente da descarboxilação de aminoácidos livres por enzimas de microrganismos (SILLA-SANTOS, 1996; LIMA & GLÓRIA, 1999; GLÓRIA, 2005).

O queijo representa um ambiente ideal para produção de aminas biogênicas e a persistência e o aumento destas substâncias depende de uma série de fatores. A formação de aminas biogênicas pode ser afetada pela disponibilidade de aminoácidos livres e pela presença de microrganismos, adicionados ou contaminantes, capazes de descarboxilar aminoácidos. Os aminoácidos se tornam disponíveis principalmente pela ação de enzimas proteolíticas de culturas iniciadoras. Além disso, condições higiênicas inapropriadas, durante a produção de queijo, podem favorecer a contaminação microbiana. Condições adequadas para o crescimento microbiano e ação das descarboxilases também são importantes, como pH, concentração de sal, temperatura, atividade de água, tempo e temperatura de maturação, temperatura de armazenamento e a presença de cofatores. O pH do queijo (5,0 – 6,5) é ideal para a atividade da maioria das descarboxilases. A produção de histamina e outras aminas biogênicas é acelerada com o aumento da temperatura durante a fabricação e armazenamento de queijos. Além disso, quanto mais longo o processo de maturação, maior o teor de algumas aminas biogênicas (EDWARD & SANDINE, 1981; PINHO et al., 2001; GENNARO et al., 2003; SANTOS et al., 2003; MARTUSCELLI et al., 2005).

As aminas têm sido encontradas em diferentes tipos de queijo com teores variáveis. Assim, vários surtos de intoxicação histamínica já foram relatados devido ao consumo de queijo (TAYLOR et al., 1985; STRATTON et al., 1991a). Enxaqueca também tem sido observada após o consumo de queijos com elevados teores de tiramina. Crise hipertensiva, geralmente acompanhada de cefaléia severa, bem como morte por hemorragia cerebral já foi observada após ingestão de queijo rico em tiramina por pacientes em tratamento com medicamentos inibidores de monoaminoxidase (REUVERS et al., 1986; MILLICHAP & YEE, 2003; GLÓRIA, 2005).

Teores de histamina e tiramina capazes de causar efeitos adversos em humanos já foram relatados em queijo ralado (VALE & GLÓRIA, 1997; PATTONO et al., 2000; PIMENTEL et al., 2001). Além disso, várias aminas que potencializam estes efeitos também estavam presentes, entre elas putrescina, cadaverina, triptamina, feniletilamina, espermina, espermidina, serotonina e agmatina. De acordo com VALE & GLÓRIA (1997) e PIMENTEL et al. (2001), as causas mais prováveis para os teores elevados de histamina e tiramina em queijo ralado são o uso de queijos de baixa qualidade microbiológica ou o uso de grande quantidade de cascas, que contêm altos teores de aminas biogênicas. A Portaria 357 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1997) prevê que na elaboração dos queijos ralados fica proibida a utilização de queijos não aptos para o consumo humano. Entretanto, esta portaria não define qual seria o critério para determinação da aptidão ao consumo.

Estudos de VALE & GLÓRIA (1997) e PIMENTEL et al. (2001) reafirmam a necessidade de pesquisas para promover a qualidade de queijo ralado, principalmente dos produzidos por uma mistura de queijos, considerando os teores de histamina e tiramina como um parâmetro de seleção da matéria-prima. Com isto, um método rápido, simples e confiável para a quantificação dessas aminas em queijo é necessário para garantir a qualidade do produto final e a saúde dos consumidores.

Está bem estabelecido que a separação das aminas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), derivação pós-coluna com o-ftalaldeído e detecção fluorimétrica é o método de escolha para a determinação quantitativa de aminas bioativas (VALE & GLÓRIA, 1997; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000; SANTOS et al., 2003). Infelizmente, poucos laboratórios de controle da qualidade das indústrias de alimentos no Brasil possuem este equipamento sofisticado. Desta forma, há a necessidade de um método alternativo rápido e confiável, utilizando etapas simples de extração, purificação e quantificação em espectrofotômetro para análise preliminar ou semi-quantitativa de histamina e tiramina em queijos.

Vários métodos foram publicados com etapas de extração, purificação, separação e quantificação distintas para a determinação de aminas bioativas em vários alimentos. No entanto, é difícil comparar os estudos, pois na maioria dos casos, não há avaliação da eficiência e seletividade de um amplo espectro de aminas; a maioria dos trabalhos avalia apenas uma a quatro aminas, apesar de já terem sido encontradas pelo menos dez aminas bioativas em queijos (VALE & GLÓRIA, 1998; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000).

Este trabalho teve como objetivo geral, avaliar a eficiência e a seletividade das etapas de extração, purificação e detecção na determinação de histamina e tiramina em queijo ralado para utilização de um método simples de análise. Os objetivos específicos foram (I) identificar o perfil e teores de histamina, tiramina e aminas interferentes em diferentes marcas e tipos de queijo ralado; (II) selecionar um solvente extrator após comparação da eficiência em recuperar histamina e tiramina e eliminar interferentes da matriz queijo parmesão ralado; (III) avaliar o potencial de utilização de ninidrina e cloreto de dansila para derivação da histamina e da tiramina para análise espectrofotométrica de absorção molecular; (IV) investigar a eficácia da extração líquido-líquido e os fatores que influenciam a purificação seletiva de histamina e tiramina de extratos de queijo parmesão ralado; e (V) investigar a eficácia e os fatores que influenciam a purificação em fase sólida de histamina e tiramina de extratos de queijo parmesão ralado e a capacidade de eliminar interferentes.

REVISÃO DA LITERATURA

1 AMINAS BIOATIVAS

1.1 DEFINIÇÃO, ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO

As aminas bioativas (figura 1) são bases orgânicas de baixa massa molecular (80 a 202), estáveis, capazes de resistir ao aquecimento e a condições ácidas e básicas (BARDÓCZ, 1995). São formadas durante os processos metabólicos normais em animais, plantas e microrganismos e estão, desta forma, presentes nos alimentos (SILLASANTOS, 1996; MEDINA et al., 2003; GLÓRIA, 2005).

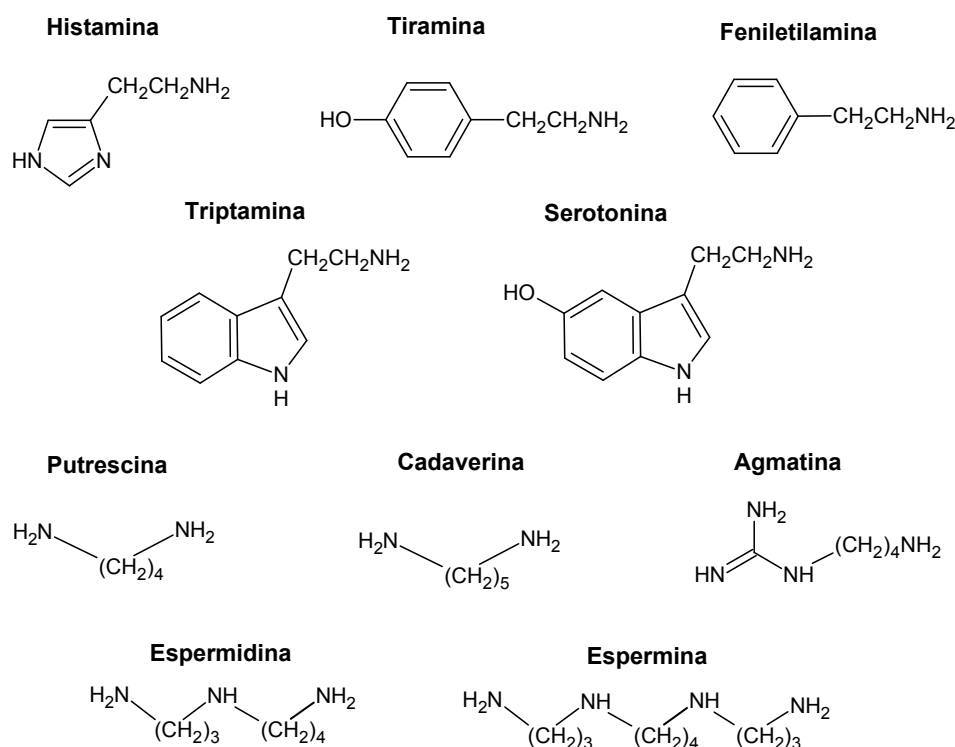


Figura 1: Estruturas químicas de algumas aminas bioativas.

As aminas bioativas são tradicionalmente conhecidas como poliaminas e aminas biogênicas, sendo diferenciadas de acordo com a via biossintética. As poliaminas são

formadas durante a biossíntese *de novo*, ou seja, a partir de uma molécula mais simples. Entre elas estão espermidina e espermina e, apesar de não possuírem mais de dois grupos amino, a putrescina e a agmatina também têm sido consideradas como poliaminas por serem precursoras da espermidina e espermina (HALÁSZ et al., 1994; LIMA & GLORIA, 1999).

As aminas biogênicas são formadas nos alimentos por reações não específicas de descarboxilação pela ação de descarboxilases de microrganismos (BARDÓCZ, 1995; MEDINA et al., 2003). São denominadas assim putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, feniletilamina e triptamina. Algumas aminas podem ser formadas tanto pela síntese *de novo*, quanto pela descarboxilação não específica.

As estruturas químicas são determinantes das características físico-químicas e influenciam a estabilidade e a determinação de cada amina. Algumas das características físico-químicas das aminas podem ser observadas na tabela 1.

O pK_a está relacionado a ionização dos grupos amino e quanto maior, mais forte será a base em questão. Em valores de pH abaixo do pK_a da substância, a espécie predominante no equilíbrio da amina será a ionizada ($R-NH_3^+$), enquanto em valores de pH acima do pK_a , a espécie predominante será a base livre ($R-NH_2$). Por isso, as aminas são normalmente mais solúveis em meio aquoso quando em soluções diluídas de ácidos.

O número de grupos amino é um fator fundamental na indicação da polaridade e solvatação das aminas bioativas, sendo que as poliaminas (espermina, espermidina e agmatina) são mais polares que as diaminas (putrescina e cadaverina) e monoaminas (tiramina e feniletilamina) e se dissolvem melhor em solventes mais polares.

As aminas podem ainda ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) ou heterocíclicas (histamina, triptamina e serotonina). Em função do grupo químico, podem ser classificadas ainda em catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (triptamina e serotonina) ou imidazolaminas (histamina).

1.2 FORMAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS

Todos os organismos vivos produzem aminas durante o processo metabólico normal por transaminação de aldeídos ou cetonas, hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos, sendo esta última, a principal via de formação (HALÁSZ et al., 1994; BARDÓCZ, 1995; KALAC & KRAUSOVÁ, 2005).

Tabela 1: Características físico-químicas de algumas aminas bioativas presentes em alimentos

AMINA	Massa molecular¹	Ponto de fusão (°C)^{1,2}	Ponto de ebulição (°C)^{1,2}	pK_a	Solubilidade^{1,2}
Histamina 1H-Imidazol-4-etanoamino	111,15	86; 83-84 C ₅ H ₉ N ₃ .2HCl: 244-246	209	¹ (25 °C) pK _{a1} = 6,04; pK _{a2} = 9,75	Água 3; etanol 3; clorofórmio 3; éter 2. C ₅ H ₉ N ₃ .2HCl: água 4; etanol 3; metanol 4
Tiramina 2- <i>p</i> -Hidroxi-feniletilamina	137,18	164-165 C ₈ H ₁₁ NO.HCl: 269	bp ₂₅ 205-207; bp ₂ 166	¹ (25 °C) pK _{a1} = 9,74; pK _{a2} = 10,52	Água 2; etanol fervente 3; benzeno 2; xileno 2. C ₈ H ₁₁ NO.HCl: solúvel em água com reação neutra
Feniletilamina Benzenoetanoamino	121,18		197,5	¹ (25 °C) 9,84	Água 3; CCl ₄ 3; éter 4.
Octopamina 1-(<i>p</i> -Hidroxifenil)-2-aminoetanol	153,18	Forma D(-): a 160 muda p/ composto c/ PF > 250 C ₈ H ₁₁ NO ₂ .HCl (forma DL): decompõe a 170			C ₈ H ₁₁ NO ₂ .HCl (forma DL): água 4
Triptamina 3-(2-Aminoetil)indol	160,21	118 C ₁₀ H ₁₂ N ₂ .HCl: 248		¹ (25 °C) 10,2	Água 1; etanol 3, acetona 3; éter 1; benzeno 1; clorofórmio 1
Serotonina (5-Hidroxitriptamina) 5-Hidroxi-3-(β-aminoetil)indol	176,21	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O.HCl: 167-168 Complexo creatinina-sulfato monohidratado: decompõe a 215		¹ (25 °C) pK _{a1} = 9,8; pK _{a2} = 11,1	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O.HCl: água 3. Complexo creatinina-sulfato: CH ₃ COOH 3; metanol 2; etanol 95% 2; etanol absoluto 1; acetona 1; clorofórmio 1; acetato de etila 1; éter 1.

Escala de solubilidade: 1 = insolúvel, 2 = pouco solúvel, 3 = solúvel, 4 = muito solúvel, 5 = miscíveis
 Fontes: ¹ LIDE (1995); ² WINDHOLZ (1996); ³ CONCA et al. (2001); ⁴ KVASNICKA & VOLDRICH, 2006.

Tabela 1: Continuação

AMINA	Massa molecular ¹	Ponto de fusão (°C) ^{1,2}	Ponto de ebulição (°C) ^{1,2}	pKa	Solubilidade ^{1,2}
Putrescina 1,4-Butanodiamino	88,15	27,5 C ₄ H ₁₂ N ₂ .2HCl: decompõe a 280	158,5 C ₄ H ₁₂ N ₂ .2HCl: sublima	¹ (20 °C) pK _a 1 = 10,80; pK _a 2 = 9,35	Água 3 C ₄ H ₁₂ N ₂ .2HCl: água 4; etanol 4; éter 1; benzeno 1
Cadaverina 1,5-Pentanodiamino	102,18	9 C ₅ H ₁₄ N ₂ .2HCl: 225- 230	179	¹ (25 °C) pK _a 1 = 10,05; pK _a 2 = 10,93. ² pK _a 1 = 10,25; pK _a 2 = 9,13. ³ pK _a 1 = 9,35; pK _a 2 = 10,8	Água 3; etanol 3; éter 2 C ₅ H ₁₄ N ₂ .2HCl: água 3; etanol 1
Espermidina N-(3-Aminopropil)-1,4- butanodiamino	145,24	Líquido C ₇ H ₁₉ N ₃ .3HCl: 256- 258	128-130	³ pK _a 1 = 8,15; pK _a 2 = 9,74; pK _a 3 = 10,24	Água 3; etanol 3; éter 3
Espermina N,N'-bis(3- Aminopropil)-1,4- butanodiamino	202,34	¹ 29; ² 55-60 (líquido)	¹ 150; ² 141-142	³ pK _a 1 = 7,91; pK _a 2 = 8,68; pK _a 3 = 10,21; pK _a 4 = 10,56	Água 3; álcoois menores 3; clorofórmio 3; éter 1; éter de petróleo 1; benzeno 1
Agmatina ² 4-(Aminobutil) guanidina	130,19	C ₅ H ₁₄ N ₄ .H ₂ SO ₄ : 231		⁴ pK _a 1 = 12,5	C ₅ H ₁₄ N ₄ .H ₂ SO ₄ : Água 3; etanol 1

Escala de solubilidade: 1 = insolúvel, 2 = pouco solúvel, 3 = solúvel, 4 = muito solúvel, 5 = miscíveis

Fontes: ¹ LIDE (1995); ² WINDHOLZ (1996); ³ CONCA et al. (2001); ⁴ KVASNICKA & VOLDRICH, 2006.

Existem vários caminhos prováveis para a síntese de poliaminas (figura 2). A putrescina é um intermediário obrigatório. Nos animais, o primeiro passo é a descarboxilação da ornitina pela ornitina-descarboxilase. Nas plantas e em alguns microrganismos, existe uma rota alternativa para produzir putrescina a partir da arginina via agmatina pela ação da arginina descarboxilase. Existe uma via adicional para a formação da putrescina a partir da citrulina (FLORES et al., 1989; HILLARY & PEGG, 2003; MEDINA et al., 2003; WALTERS, 2003; GLÓRIA, 2005).

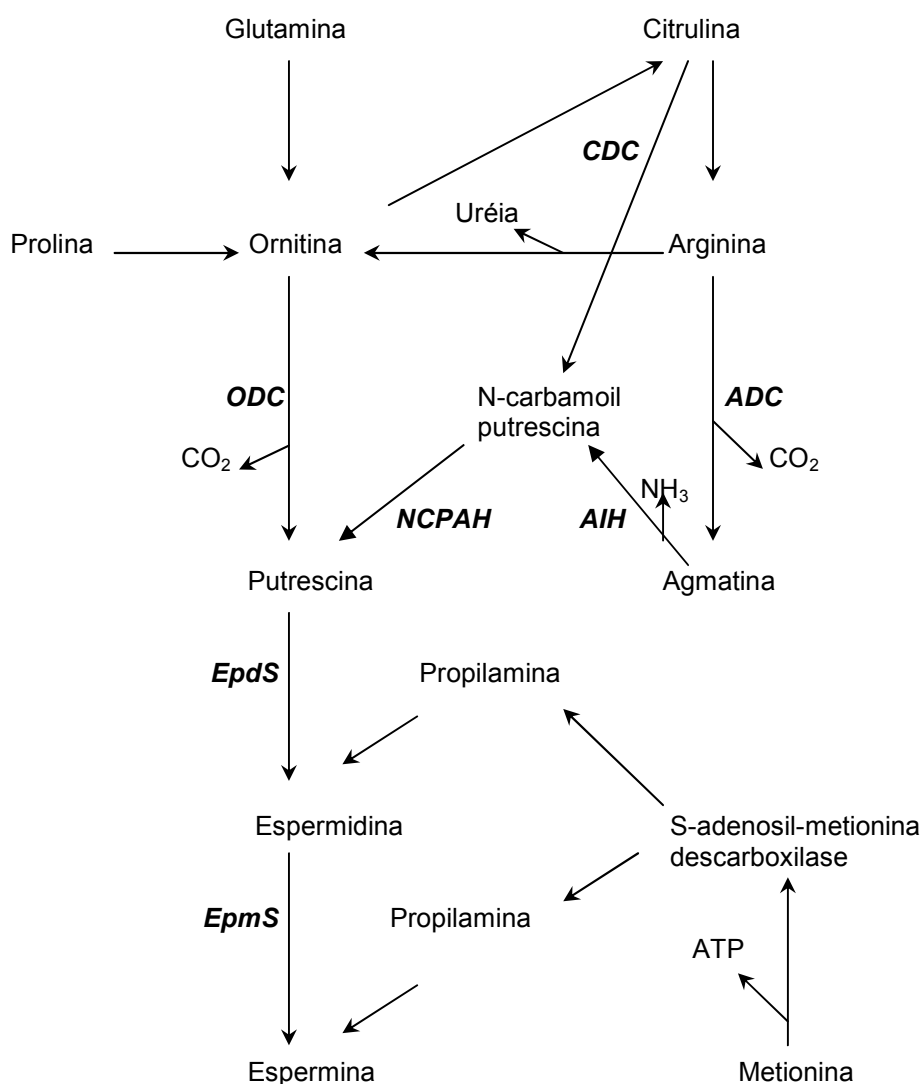


Figura 2: Vias para a síntese de poliaminas.

ODC: ornitina descarboxilase; ADC: arginina descarboxilase; CDC: citrulina descarboxilase; AIH: agmatina imino-hidrolase; NCPAH: N-carbamoil putrescina hidrolase; EpmS: espermina sintase; EpdS: espermidina sintase.

Fonte: GLÓRIA (2005).

A síntese de histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina e cadaverina em alimentos ocorre via descarboxilação dos aminoácidos histidina, tirosina, triptofano, fenilalanina e lisina, respectivamente, por atividade enzimática (HALÁSZ et al., 1994).

A formação de aminas associada à atividade bacteriana em alimentos envolve espécies capazes de produzir enzimas descarboxilantes que atuam sobre o aminoácido precursor (SILLA-SANTOS, 1996). Desta forma, o acúmulo de aminas nos alimentos depende do teor de aminoácidos livres, da presença de microrganismos com atividade descarboxilante sobre aminoácidos, da existência de condições favoráveis para o crescimento de microrganismos e da produção e ação das enzimas. Os aminoácidos livres podem ocorrer naturalmente ou serem liberados de proteínas como resultado da atividade de microrganismos proteolíticos (MAGA, 1978; HALÁSZ et al., 1994).

Inúmeras bactérias têm sido descritas como capazes de produzir aminas em alimentos. Dentre os microrganismos encontrados em queijos, os formadores de tiramina são na maioria bactérias Gram positivas (enterococos e algumas bactérias lácticas) e os formadores de histamina são principalmente enterobactérias, mas também algumas bactérias lácticas e clostrídios (ROIG-SAGUÉS et al., 2002). Desta forma, já foi relatada a formação de aminas por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Hafnia alvei* ao lado de espécies de *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Clostridium sporogenes*, *C. perfringens*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus* (EDWARDS & SANDINE, 1981; JOOSTEN & NORTHOLT, 1987; MARINO et al., 2000; SANTOS et al., 2003; COSENTINO et al., 2004; ÖZOGUL, 2004). Como várias destas bactérias são deterioradoras de alimentos, a presença de aminas bioativas têm sido sugerida por vários autores como um critério de qualidade.

A produção de aminas por bactérias é influenciada pelo pH do meio, temperatura, sais, como NaCl (SANTOS et al., 2003), atividade de água, presença de oxigênio e de carboidratos fermentáveis, que permitam o crescimento microbiano e a atividade enzimática, e ainda pela presença de cofatores, como o piridoxal fosfato necessário para a atividade das descarboxilases (SHAHANI et al., 1962). Estudos mostram que o pH na faixa de 2,5 a 6,5 estimula a produção de aminas como um mecanismo de proteção da bactéria. A atividade das enzimas descarboxilantes mostrou ser dependente da fase de crescimento do microrganismo, sendo mais elevada na fase estacionária. Com relação à temperatura, as descarboxilases são mais ativas em temperaturas inferiores a 30 °C e sem atuação acima de 40 °C. Entretanto, na faixa de 0 a 10 °C, a atividade dependerá da microbiota presente. Foi observado que a redução do potencial redox estimula a produção

de histamina e que a histidina descarboxilase parece ser inativada ou destruída na presença de oxigênio. A presença de carboidratos fermentáveis, como a glicose, estimula o crescimento e a atividade descarboxilase das bactérias. Concentrações de glicose consideradas ótimas estão na faixa entre 0,5 e 2%, enquanto níveis acima de 3% inibem a formação das enzimas (EDWARDS & SANDINE, 1981; HALÁSZ et al., 1994; PINHO et al., 2001).

1.3 ASPECTOS FUNCIONAIS E TOXICOLÓGICOS

Dentre as aminas bioativas, as poliaminas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo componentes indispensáveis em todas as células vivas. Devido à diversidade funcional no metabolismo e crescimento celular, estas substâncias são requeridas em grandes quantidades nos tecidos em rápido crescimento (KALAC & KRAUSOVÁ, 2005).

Entre as diversas funções das poliaminas nas células estão divisão e diferenciação celular, síntese de ácidos nucleicos e proteínas e estabilidade de membranas. As poliaminas são essenciais para a manutenção da alta atividade metabólica no funcionamento saudável do intestino, por estarem envolvidas no reparo de danos intestinais causados por componentes deletérios dos alimentos e microrganismos (BARDÓCZ et al., 1993; DELOYER et al., 2001). Em plantas, além dessas funções, as poliaminas têm sido associadas às respostas ao pH e ao estresse osmótico ou térmico, à floração e ao desenvolvimento do fruto, à inibição da produção de etileno e ao atraso na senescência (BARDÓCZ, 1995; MEDINA et al., 2003; KALAC & KRAUSOVÁ, 2005).

As catecolaminas, as indolaminas e a histamina cumprem importantes funções metabólicas em humanos, especialmente no sistema nervoso e no controle da pressão arterial (GILMAN et al., 2003). Histamina, serotonina, dopamina, adrenalina e noradrenalina atuam como neurotransmissores no sistema nervoso central. Tiramina, feniletilamina, dopamina, adrenalina, noradrenalina e triptamina causam um aumento na pressão sanguínea por constrição do sistema vascular e aumento da velocidade e da força da contração cardíaca. A serotonina é vasoconstritora, broncoconstritora, reduz o volume e a acidez do suco gástrico, tem efeito antidiurético, estimula o músculo liso e afeta o metabolismo de carboidratos. A histamina é capaz de estimular diretamente o sistema cardiovascular, atuar no relaxamento e contração de músculo liso, estimular neurônios sensoriais e motores e controlar a secreção ácida do estômago (TAYLOR, 1986; LIMA & GLÓRIA, 1999; GILMAN et al., 2003; MECK et al., 2003).

Embora as aminas desempenhem funções fisiológicas essenciais, estudos toxicológicos e inquéritos epidemiológicos têm comprovado o risco potencial do consumo de alimentos contendo altos teores de histamina e tiramina (TAYLOR, 1985 e 1986; MAHER et al., 2000; OHNUMA et al., 2001; FELDMAN et al., 2005; TSAI et al., 2005a). Este risco ocorre principalmente se houver deficiência na biotransformação das aminas ou se ocorrerem efeitos sinérgicos ou potencializadores (HALÁSZ et al., 1994; LIMA & GLÓRIA, 1999).

Sob condições normais, as aminas em quantidades normalmente presentes nos alimentos são rapidamente metabolizadas no organismo por conjugação ou mediante reações de oxidação por aminoxidases, como as monoaminoxidases (MAO), as diaminoxidases (DAO) e as poliaminoxidases (PAO). A histamina é inativada principalmente pela histamina-N-metiltransferase (HMT) para formar a N-metil-histamina, que é oxidada pela MAO. Como alternativa, a histamina pode sofrer desaminação oxidativa pela DAO (GILMAN et al., 2003). A tiramina é oxidada pela MAO (McCABE, 1986).

Algumas aminas, especificamente putrescina e cadaverina, inibem a DAO e a HMT (HUI & TAYLOR, 1985; SILLA-SANTOS, 1996); a tiramina pode inibir a MAO e a triptamina, a DAO. Além disso, certas drogas, como antihistamínicos, antimaláricos, alguns antidepressivos e a isoniazida (antibiótico utilizado no tratamento da tuberculose), podem inibir essas enzimas (STRATTON et al., 1991a). O álcool também é considerado um potencializador dos efeitos tóxicos da histamina e tiramina por inibir a MAO (GLÓRIA et al., 1998). A presença de potencializadores pode explicar porque os teores de histamina em peixes deteriorados e queijos maturados capazes de causar intoxicação, são menores que os da histamina em solução aquosa (TAYLOR et al., 1984).

A intoxicação alimentar mais freqüente causada por aminas está relacionada à histamina. A histamina é uma substância bioativa potente e apresenta muitas atividades no organismo; desta forma, seus efeitos tóxicos se manifestam em uma ampla variedade de sintomas. Os mais característicos que afetam a pele incluem *rash*, urticária, rubor e edema. Os sintomas gastrintestinais se caracterizam por náusea, diarreia e cólicas abdominais. Outros sintomas são ainda identificados, como a hipotensão, cefaléia, taquicardia, formigamento e sensações de queimação na boca (TAYLOR, 1986; GILMAN et al., 2003; GLÓRIA, 2005).

Vários surtos de intoxicação foram registrados nos Estados Unidos, Japão, Inglaterra, França, Dinamarca, Canadá, Nova Zelândia, sendo mais implicados os peixes das famílias *Scombridae* (atum, bonito, cavala, listrado), *Scomberesocidae* (tiravira),

Clupeidae (arenque, sardinha), dentre outros (TAYLOR, 1986; MAHER et al., 2000; OHNUMA et al., 2001; FELDMAN et al., 2005).

Além do peixe, outro alimento associado aos surtos de intoxicação histamínica é o queijo. O primeiro registro de intoxicação ocorreu na Holanda, em 1967, e envolveu o queijo tipo Gouda. Desde então, vários casos têm sido citados, sendo os queijos tipo Cheddar, Gouda, Gruyère e o Suíço os mais envolvidos (STRATTON et al., 1991a; LIMA & GLÓRIA, 1999). Em 1976, um surto de intoxicação histamínica ocorreu nos Estados Unidos envolvendo 38 indivíduos e incriminando o queijo Suíço, com concentração de histamina superior a 100 mg/100 g de queijo. Um segundo surto menor com queijo Suíço ocorreu também nos Estados Unidos, envolvendo seis pessoas. Na França, de 1980 a 1983 ocorreram quatro surtos envolvendo o queijo Gruyère, sendo a concentração de histamina de 30 mg/100 g de queijo (TAYLOR, 1986; STRATTON et al., 1991a).

A tiramina é o segundo tipo de amina envolvida em intoxicações alimentares. Atua aumentando a pressão sangüínea por aumento da força da contração cardíaca (TIL et al., 1997; GILMAN et al., 2003; MECK et al., 2003). Em concentrações elevadas, pode causar dor de cabeça, enxaqueca, febre, vômito e aumento da glicemia (MARLEY & BLACKWELL, 1970; McCABE, 1986; MILLICHAP & YEE, 2003; GLÓRIA, 2005). O aumento de pressão causado pela tiramina presente em alimentos pode desencadear uma crise hipertensiva, principalmente em pacientes em tratamento com inibidores da MAO. Este aumento de pressão também é conhecido como “síndrome do queijo”, devido ao fato do queijo ter sido o alimento inicialmente associado aos distúrbios hipertensivos (STRATTON et al., 1991a).

Existem na literatura algumas doses tóxicas de tiramina e histamina em alimentos. IENISTEA (1973) relatou que 5 a 10 mg de histamina em 100 g de alimento podem causar sintomas em indivíduos mais sensíveis; entre 10 e 100 mg, a histamina é potencialmente tóxica e acima de 100 mg, apresenta toxicidade elevada. Com isto foram sugeridos limites máximos de 10 mg de histamina/100 g de alimento, 2 mg de histamina/L de bebida alcoólica, 10 a 80 mg de tiramina/100 g de alimento ou 6 mg de tiramina/100 g de alimento, caso o indivíduo esteja utilizando algum inibidor da MAO, e 3 mg de feniletilamina/100 g de alimento (CHANG et al., 1985; HALÁSZ et al., 1994). SHALABY (1996) relata também, que a ingestão de mais de 40 mg de aminas biogênicas por refeição tem sido considerada potencialmente tóxica, e que a soma de tiramina, histamina, putrescina e cadaverina não deveria exceder 90 mg/100 g de queijo.

No Brasil, o teor de histamina em pescado é utilizado como critério de qualidade higiênico-sanitário. O limite de histamina permitido em conservas de pescado é

100 mg/100 g (BRASIL, 2002), sendo ainda um valor elevado, que não considera a presença das outras aminas bioativas.

1.4 AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJOS

Muitos estudos têm sido conduzidos para determinar o conteúdo de aminas em queijos, indicando a presença, principalmente, de histamina, tiramina, triptamina, putrescina, cadaverina e feniletilamina (JOOSTEN & OLIEMAN, 1986; SIMON-SARKADI et al., 1995; VALSAMAKI et al., 2000; INNOCENTE & D'AGOSTIN, 2002; ÖNER et al., 2004 e 2006). Foram encontradas também com menor frequência, e em menores quantidades, espermidina, espermina, agmatina e serotonina (EL-SAYED, 1996; VALE & GLÓRIA, 1998; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000).

Conforme indicado na tabela 2, os teores e tipos de aminas encontrados variam com o tipo de queijo e também entre amostras de um mesmo tipo. Queijos não maturados ou com curto tempo de maturação, como Minas e Prato apresentaram baixos teores de aminas biogênicas. Em queijos de longa maturação, aminas como a histamina e a tiramina foram encontradas em teores elevados, capazes de causar efeitos tóxicos, principalmente em pacientes em tratamento com medicamentos inibidores da MAO.

Algumas aminas estão presentes no leite em concentrações reduzidas (NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000; SANTOS et al., 2003). Entretanto, durante a fabricação, maturação e armazenamento do queijo, pode ocorrer aumento nos teores de aminas, sendo este aumento dependente de uma série de fatores, como pH do meio, temperatura, atividade de água, presença de oxigênio, carboidratos fermentáveis, co-fatores de enzimas, os quais indicam que o queijo representa um ambiente ideal para a formação de aminas (JOOSTEN, 1987; ROIG-SAGUÉS et al., 1998).

Os microrganismos com atividade descarboxilante sobre aminoácidos podem estar associados ao leite utilizado como matéria-prima ou estarem no queijo por contaminação durante o processamento e estocagem ou serem adicionados através das culturas iniciadoras (STRATTON et al., 1991a; SIMON-SARKADI et al., 1995; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2004). Não existe consenso com relação à fonte mais significativa de bactérias aminoácido descarboxilantes durante o processamento do queijo: a qualidade microbiológica do leite, a contaminação durante o processamento, ou as próprias culturas adicionadas (STRATTON et al., 1991a).

Tabela 2: Teores de aminos bioativas em queijos

Queijos	Teores de aminos bioativas* (mg/100 g)						Referência
	TIM	HIM	PUT	CAD	FEM	TRM	
Blue cheese	5,0-110,0	nd-230,0	4,4	4,2	1,0	nd-110,0	1, 4
Camembert	7,0-21,0	nd-48,0	-	-	-	nd-6,0	1, 4
Cheddar	nd-153,0	nd-212,0	22,0-26,0	21,0-35,0	nd-30,3	nd-30	1, 4, 6
Gorgonzola	nd-146,0	0,45-84,6	0,17-3,7	nd-23,3	0,07-1,0	nd-2,8	5, 6
Gouda	nd-67,0	nd-45,0	nd-354,2	nd-114,2	nd-1,9	nd-20,0	1, 5, 6
Minas	nd	nd-2,50	nd-2,64	nd-0,30	nd-0,64	nd-0,72	5
Montasio	12,8-39,4	10,1-37,8	12,9-110	0,45-3,02	0,77-2,0	0,18-0,81	7
Mussarela	nd-16,0	nd-11,3	nd-1,4	nd-2,3	nd-0,26	nd-10,0	1, 5, 6
Parmesão	nd-28,0	nd-29,3	nd-4,3	nd-9,8	nd-0,04	nd	1, 2, 4,5
Parmesão ralado	0,12-5,20	0,11-8,69	0,08-6,30	0,07-13,4	nd-1,98	nd-0,34	5
Prato	nd-1,75	nd-6,15	nd-3,53	nd-3,39	nd-1,19	nd-0,90	5
Processado	nd-16,0	nd-3,2	nd-6,0	nd-12,0	nd-40,0	nd	3, 6
Provolone	nd-0,44	nd-6,0	nd-8,17	nd-111,0	nd-1,4	nd-1,08	5
Suíço	nd-180,0	nd	-	-	nd-7,8	nd-16,0	1, 4

* TIM: tiramina; HIM: histamina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEM: feniletilamina; TRM: triptamina; nd: não detectado; -: não determinado.

Fonte: [1] VOIGT et al. (1974); [2] HALÁSZ et al. (1994); [3] EL-SAYED (1996); [4] ROIG-SAGUÉS et al. (1998); [5] VALE & GLÓRIA (1998); [6] PATTONO et al. (2000); [7] INOCENTE & D'AGOSTIN (2002).

Os fatores que interferem na formação de aminos bioativas durante a maturação de queijos têm sido estudados com o intuito de reduzir os teores das aminos. O efeito do tratamento térmico do leite no acúmulo de aminos biogênicas em diferentes queijos tem sido descrito. NOVELLA-RODRÍGUEZ et al. (2004) identificaram que o queijo obtido com leite pasteurizado apresentou menor formação de aminos biogênicas durante a maturação, devido à redução na contagem microbiana, comparado ao queijo obtido com leite cru. GAYA et al. (2005) observaram a formação de aminos biogênicas apenas no queijo obtido com leite cru e o teor de aminoácidos livres foi superior neste tipo de queijo. MARTUSCELLI et al. (2005) não observaram diferença nos teores totais de aminos em queijos obtidos com leite cru e pasteurizado, no entanto o teor de histamina foi significativamente superior no queijo obtido com leite cru.

Em estudo realizado com leite adicionado de cultura láctica a uma temperatura de incubação de 20 e 32 °C durante 24 h, comprovou-se que os teores das aminos cadaverina, espermidina, tiramina e histamina aumentavam com o tempo e temperatura de incubação. Estes resultados sugerem que para evitar a formação ou minimizar os teores de aminos formados, deve-se manter a temperatura no menor valor possível (SANTOS et al., 2003). Neste mesmo trabalho, os autores sugeriram que as culturas

iniciadoras são capazes de afetar os tipos e os teores de aminas. Desta forma elas devem também ser selecionadas quanto à produção de aminas.

A importância da temperatura de armazenamento do queijo também foi investigada por PINHO et al. (2001), que observaram maior formação de aminas biogênicas e maior teor de aminoácidos livres nos queijos armazenados a temperatura ambiente (25 °C) comparados aos armazenados a 4 °C.

Estes estudos demonstraram que é possível controlar a formação de aminas biogênicas, principalmente tiramina e histamina, com boas práticas de fabricação, utilizando matéria-prima de boa qualidade, leite com tratamento térmico, culturas iniciadoras selecionadas (não produtoras ou com baixa produção de aminas biogênicas) e controle do tempo e temperatura durante a maturação e armazenamento (PINHO et al., 2001; SANTOS et al., 2003; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2004; GAYA et al., 2005; MARTUSCELLI et al., 2005).

2 QUEIJO RALADO

Queijo ralado é o produto obtido pelo esfarelamento ou ralagem da massa de uma ou até quatro variedades de queijos de baixa umidade adequados para consumo humano (BRASIL, 1997). O produto pode ser parcialmente desidratado ou não, sendo classificado em desidratado ou em não submetido à desidratação. Os queijos ralados classificam-se também de acordo com as variedades dos queijos utilizados na sua elaboração em: (i) elaborados com uma única variedade de queijo; (ii) elaborados unicamente com queijos de baixa umidade; e (iii) elaborados com queijos de média umidade com ou sem queijos de baixa umidade.

O queijo ralado deve apresentar, como características sensoriais, aspecto e textura de grânulos ou filetes mais ou menos finos, cor branca a amarelada e odor característico mais ou menos intenso de acordo com as variedades de queijos das quais provenha. Alguns requisitos físico-químicos também foram estabelecidos. Quanto à umidade, os queijos ralados desidratados com predominância (> 50%) de queijos de baixa umidade deverão apresentar umidade máxima de 20 g/100 g, enquanto os com predominância de queijos de média umidade deverão apresentar umidade máxima de 30 g/100 g.

Quanto à presença de aditivos, são permitidos nos queijos ralados aqueles autorizados no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos para os queijos utilizados como matéria-prima e sua concentração no produto final deverá corresponder aos limites máximos autorizados neste Regulamento (BRASIL, 1997). É admitida a presença de ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio, isolados ou em combinação, na concentração máxima de 1000 mg/kg. Nitrato de sódio ou potássio, isolados ou combinados, são permitidos na concentração máxima de 50 mg/kg, expresso em nitrato de sódio. Ambos ácido sórbico e nitrato são utilizados com a função de conservador. Admite-se, além disso, o uso dos aditivos necessários à fabricação de tipos específicos de queijos, não podendo superar as concentrações máximas indicadas no produto final, independente da concentração dos referidos aditivos nos queijos usados como matéria-prima (BRASIL, 1997).

Quanto aos critérios microbiológicos, o queijo ralado deve estar de acordo com o estabelecido pela Resolução n. 12 de 2 de janeiro de 2001 (ANVISA, 2001) para os parâmetros Coliformes a 45 °C, Estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* sp. Para os queijos ralados elaborados a partir de queijos de média umidade é necessário analisar também *Listeria monocytogenes*.

Na elaboração dos queijos ralados é proibida a utilização de queijos não aptos para o consumo humano, podendo, no entanto, serem admitidos aqueles que não estão adequados para venda ao público por apresentarem falhas morfológicas ou de apresentação comercial, sempre que não afetem a qualidade do produto final (BRASIL, 1997).

Com relação à qualidade microbiológica de queijos ralados, FRANCO & ALMEIDA (1992) avaliaram 10 amostras de queijo parmesão ralado embalado e observaram que 100% das amostras atenderam a legislação vigente do período. HOFFMANN et al. (2004) analisaram bactérias mesófilas, fungos e bolores, coliformes fecais e totais, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. em várias marcas de queijo ralado comercializadas em São Paulo. Os resultados revelaram que 10% das amostras apresentavam níveis inaceitáveis de contaminação de *S. aureus*.

PIMENTEL (2001) avaliou a qualidade de 18 marcas brasileiras de queijos ralados por meio dos parâmetros microbiológicos e dos teores de dez aminas bioativas. Foi observado que 100% das amostras de queijos “parmesão ralado”, “tipo parmesão ralado” e “ralado” não apresentaram células viáveis dos microrganismos pesquisados segundo a legislação vigente no período do estudo (ANVISA, 2001). No entanto, histamina e tiramina

foram detectadas em teores capazes de causar efeitos tóxicos ao homem em 50 e 66% do total de amostras, respectivamente.

Teores elevados de aminas já foram encontrados em queijos ralados, principalmente nos obtidos da mistura de diferentes tipos de queijos, entre eles Prato, Edam, Sbrinz, Reino, Tilsit, Mussarela e Provolone (VALE & GLÓRIA, 1998). Os autores sugeriram que este achado poderia ser devido ao uso de queijos com defeitos ou o uso de grandes quantidades de cascas, que apresentam maior teor de aminas. PATTONO et al. (2000) analisaram quatro aminas biogênicas (putrescina, cadaverina, histamina e tiramina) em oito marcas italianas de queijo ralado. Histamina foi encontrada em 100% das amostras com teores variando de 0,96 a 12,14 mg/100 g; putrescina foi encontrada em teores menores, 0,05 a 0,20 mg/100 g em 62,5%; tiramina e cadaverina foram encontradas em 37,5% e em baixos teores (traços a 1,32 mg/100 g).

Os queijos usados como matéria-prima têm condições mais favoráveis de formação de aminas que os queijos ralados, que possuem baixa umidade e atividade de água, e ainda podem apresentar substâncias conservadoras em sua composição. Desta forma, a causa mais provável da presença de teores elevados de aminas biogênicas no queijo ralado é a má qualidade microbiológica dos queijos utilizados em sua fabricação. PIMENTEL (2001) sugeriu que os teores de histamina e tiramina em queijos, que serão usados para a produção de queijo ralado no Brasil, fossem utilizados como critério para avaliar a aptidão ao consumo do produto final. Baseado na dose tóxica das aminas e no percentual de umidade perdido durante o processo de secagem, e considerando uma margem de 10% de segurança, PIMENTEL (2001) sugeriu como limite para histamina 7 mg/100 g e para tiramina 4 mg/100 g em queijos de baixa umidade (até 35,9 g/100 g) – como Parmesão, Reggiano, Sbrinz, Provolone curado, Reino, Romano, Montanhês, Edam, Quartiolo e para queijos de média umidade (36,0 a 45,9 g/100 g), como Prato e Tilsit. Estes valores são mais baixos que os limites para pescado estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2002). Mas neste trabalho com queijos ralados, foram avaliados os valores das outras aminas bioativas, que são fundamentais na resposta tóxica final.

3 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE AMINAS

Os estudos de ocorrência de aminas bioativas, bem como os de controle de sua formação em alimentos não seriam possíveis sem o suporte dos métodos analíticos.

Vários procedimentos têm sido desenvolvidos para isolar e quantificar aminas em alimentos; entretanto, pesquisas continuam sendo realizadas para desenvolver métodos mais simples, rápidos, sensíveis e de menor custo. As técnicas usuais para a determinação de aminas envolvem as etapas de extração, purificação, separação e quantificação (TAYLOR, 1985).

O método atualmente descrito pela AOAC (1995) para determinação de histamina em peixe foi originalmente desenvolvido por STARUSZKIEWICZ et al. (1977). De acordo com o procedimento, a amostra é homogeneizada com metanol à quente, filtrada, aplicada a uma coluna de troca aniônica e, então, é realizada a derivação com o-ftalaldeído (OPA), seguida de determinação fluorimétrica. No entanto, vários pesquisadores sugerem para a determinação de histamina; e de outras aminas; o uso de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou de outros métodos também seletivos que garantam a separação de aminas e outras substâncias que podem interferir na análise (ZEE et al., 1981; HURST, 1990; MORET & CONTE, 1996; VIEITES et al., 1997). Entretanto, os equipamentos necessários nas análises mais sensíveis e seletivas são sofisticados, nem sempre disponíveis em laboratórios de rotina.

Em seguida, será discutida a importância de cada etapa da determinação de aminas e exemplos de métodos já utilizados.

3.1 EXTRAÇÃO

Devido à complexidade da matriz dos queijos, caracterizada pelos elevados teores de gordura e proteínas (NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000) e pelas aminas ocorrerem nos alimentos geralmente em misturas complexas e em baixas concentrações, a extração e purificação são etapas críticas para recuperação adequada das aminas (MORET & CONTE, 1996).

A eficiência da extração depende do tipo e natureza das aminas presentes e dos alimentos a serem analisados (ZEE et al., 1983). Nesta etapa, dois parâmetros são importantes, um é o solvente usado para a extração, que está relacionado com a matriz a ser analisada, e o outro é a forma de preparo da amostra (MORET & CONTE, 1996).

As reações de protonação da amina e sua reversão para a forma não protonada, em função do pH, são obviamente cruciais no isolamento e análise dessas substâncias. Desta forma, a combinação apropriada de pH e solubilidade das aminas e de seus sais, em soluções aquosas e em solventes orgânicos, tem sido bastante explorada (BOUCHEREAU et al., 2000). A histamina apresenta elevada solubilidade em água,

etanol e clorofórmio quente e seu sal dicloridrato apresenta alta solubilidade em água e metanol e média em etanol (Tabela 1). A tiramina, por sua vez, apresenta solubilidade de 1 g em 95 mL de água à 15 °C e em 10 mL de etanol fervente; na forma do sal cloridrato é solúvel em água com reação de neutralização (WINDHOLZ, 1996). A solubilidade das outras aminas presentes em alimentos pode ser observada na tabela 1.

A extração de aminas de uma matriz sólida pode ser realizada com água, à temperatura ambiente (INGLES et al., 1985) ou em temperaturas elevadas (VOIGT et al., 1974), bem como com solventes orgânicos como metanol (TAYLOR et al., 1978; GLÓRIA & SOARES, 1993; AOAC, 1995) e etanol (SATO et al., 1970; WHEATON & STEWART, 1970) sendo possível, nestas condições, extrair apenas as aminas livres. Pode-se também, utilizar reagentes ácidos como o ácido clorídrico (EDWARDS & SANDINE, 1981; GENNARO et al., 2003; CINQUINA et al., 2004; MARTUSCELLI et al., 2005), ácido perclórico (BAKER et al., 1987; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000; MINOCHA & LONG, 2004; ÖNER et al., 2006), ácido tricloroacético (JOOSTEN & OLIEMAN, 1986; PATTONO et al., 2000; LAPA-GUIMARÃES & PICKOVA, 2004) ou ácido sulfosalicílico (WHEATON & STEWART, 1965; POLLACK et al., 1992; BUTS et al., 1995), sendo possível, nestas condições, extrair as aminas ligadas a outros componentes da matriz, dependendo da concentração do ácido. Pode-se ainda realizar uma extração aquosa em meio alcalino, como no método descrito utilizando tampão borato em pH 10,4 (JALON et al., 1983; BAILEY et al., 2003; MARKS & ANDERSON, 2005).

De modo geral, a extração é feita pela agitação da amostra triturada e adicionada de padrão interno, com ácido em agitador orbital. O extrato é centrifugado à 4 °C, por 10 a 30 min, a uma velocidade de 3.000 a 26.000 x g dependendo do tipo de amostra. A adição de ácido, agitação e centrifugação são repetidas por mais vezes e os extratos são combinados e filtrados em papel de filtro. O extrato obtido pode ser utilizado diretamente ou passar por etapa de purificação antes da determinação (ZEE et al., 1983; SIMON-SARKADI et al., 1994; SHALABY, 1995; VALE & GLÓRIA, 1997; VASUNDHARA et al., 1998; SADAIN & KOROPCHAK, 1999; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000; LAPA-GUIMARÃES & PICKOVA, 2004; MARTUSCELLI et al., 2005).

3.2 PURIFICAÇÃO

Alguns extratos necessitam de purificação antes da etapa de separação para remover interferentes, como carboidratos, lipídeos, aminoácidos e pigmentos. Essa etapa pode ser realizada por extração líquido-líquido ou por extração em fase sólida, utilizando-

se cartuchos apolares ou resinas de troca iônica (VALE & GLÓRIA, 1997; CALBIANI et al., 2005; MOLINS-LEGUA & CAMPIS-FALCÓ, 2005).

3.2.1 Extração líquido-líquido

Na purificação por partição ou extração líquido-líquido de aminas, o pH do extrato é primeiramente ajustado a um valor alcalino com hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio, hidróxido de amônio ou carbonato de sódio (HURST, 1990; MORET & CONTE, 1996) e o extrato é saturado com cloreto de sódio, carbonato de sódio ou outro (TAYLOR et al., 1978). Em seguida, realiza-se a extração com solvente orgânico, que pode ser *n*-butanol (EDWARDS & SANDINE, 1981; MORET & CONTE, 1996; PANTAGE et al., 2005), clorofórmio:*n*-butanol (MIETZ & KARMAS, 1978; NAGUIB et al., 1995; EL-SAYED, 1996), éter etílico (NAKAMURA et al., 1979; VALE & GLÓRIA, 1997), acetato de etila (SEN, 1969; JALON et al., 1983), entre outros.

A presença do sal é muito importante na recuperação adequada de aminas pelo efeito de saturação do meio pelo aumento da força iônica (efeito “*salting out*”) e por evitar a formação de emulsão entre as fases (VOGEL, 1989). VALLETRISCO et al. (1989) indicaram o Na_2CO_3 como o sal ideal para obter extrações quantitativas, estando de acordo com os resultados encontrados por TAYLOR et al. (1978) no estudo do efeito da saturação de vários sais na purificação de histamina. No entanto, alguns autores relataram que é mais difícil padronizar a saturação com este sal, devido às diferentes quantidades de solutos presentes em diferentes matrizes que podem influenciar a solubilidade do Na_2CO_3 , variando também o valor de pH alcançado. Além disso, a solubilidade do Na_2CO_3 é influenciada pela temperatura e uma variação de 5 °C pode causar diferenças de 0,5 unidades de pH (MORET & CONTE, 1996; CASAL et al., 2002). Devido a estes problemas não serem relatados para o NaCl, este sal tem sido selecionado para a saturação dos extratos na purificação das aminas por extração líquido-líquido em vários estudos (SHORE et al., 1959; NAGUIB et al., 1995; LANGE et al., 2002).

O pH exerce grande influência no equilíbrio da partição de aminas entre a fase aquosa e a orgânica. MORET & CONTE (1996) avaliaram a influência do pH na recuperação de oito aminas purificadas por extração líquido-líquido em queijo, carne e pescado e observaram que é essencial controlar o pH para obter resultados reprodutíveis. Estes autores concluíram que o pH 11,5 representa o valor ideal para a maioria das aminas, exceto para tiramina que apresenta sua recuperação drasticamente reduzida, chegando a um valor mínimo entre pH 12,5 e 13,0 devido à ionização da hidroxila

fenólica. Ainda há grande variabilidade nos valores de pH utilizados em vários estudos. VOIGT et al. (1974) e EDWARDS & SANDINE (1981) analisaram histamina, tiramina e triptamina, utilizando *n*-butanol na etapa de purificação por extração líquido-líquido, em extratos de queijos com pH ajustado em 10 e superior a 12, respectivamente. INNOCENTE & D'AGOSTIN (2002) analisaram seis aminas utilizando *n*-butanol e extratos de queijos com pH ajustado em 11,5. Vários autores não descrevem os valores de pH utilizados durante a análise, mas alguns relatam a quantidade de base utilizada, sugerindo alcançar valores aproximados de 11 (SHORE et al., 1959), 12 (NAGUIB et al., 1995) e superiores a 13 (VALE & GLÓRIA, 1997; LANGE et al., 2002).

Segundo MORET & CONTE (1996), *n*-butanol:clorofórmio (1:1) é eficiente para purificação de aminas em amostras de peixe e produtos cárneos e *n*-butanol para queijos. Entretanto, VALE & GLÓRIA (1997) observaram que a purificação com éter etílico foi mais eficiente para queijos comparado ao *n*-butanol. Ainda não há um consenso sobre qual a condição mais adequada para purificação das aminas bioativas em queijo.

A purificação por extração líquido-líquido clássica utilizando o funil de separação tem sido freqüentemente associada a algumas desvantagens, como formação de emulsão, separação ineficiente das fases, e alto consumo de solventes e de tempo. Procedimentos alternativos de preparo de amostra têm sido estudados como a extração sólido-líquido com a utilização de um tipo de terra diatomácea (Extrelut®) que adsorve a amostra de base aquosa em uma grande área de contato, permitindo a extração do componente de interesse ao passar o solvente orgânico através do suporte, conforme demonstrado na figura 3. A teoria do uso de Extrelut® não é diferente da extração líquido-líquido, isto é, a amostra deve ter o pH ajustado na faixa adequada para o composto em questão; é possível ainda adicionar sal ao extrato para uma melhor eficiência da extração pelo efeito *salting out* e a adição do solvente imiscível em água deve ser feita em pequenas porções (VWR..., 2005b). Este procedimento tem sido preferido por alguns autores por ser mais prático, por economia de solvente e pela facilidade de separação das duas fases sem a formação de emulsão (Di MUCCIO et al., 1999). O custo do material deve ser avaliado para análise da viabilidade do uso.

Extrelut® tem sido utilizada na purificação de amostras para análise de anfetamina e outros fármacos em material biológico (KUDO et al., 2003; NISHIDA et al., 2003), fungicidas em hortaliças (Di MUCCIO et al., 1999), aminas heterocíclicas em vários alimentos (JANOSZKA et al., 2001; SANTOS et al., 2004; WARZECHA et al., 2004) e aminas bioativas de meio de cultura (BILIC, 1996). Não há muitos dados sobre a utilização desta, na purificação de aminas bioativas de alimentos.

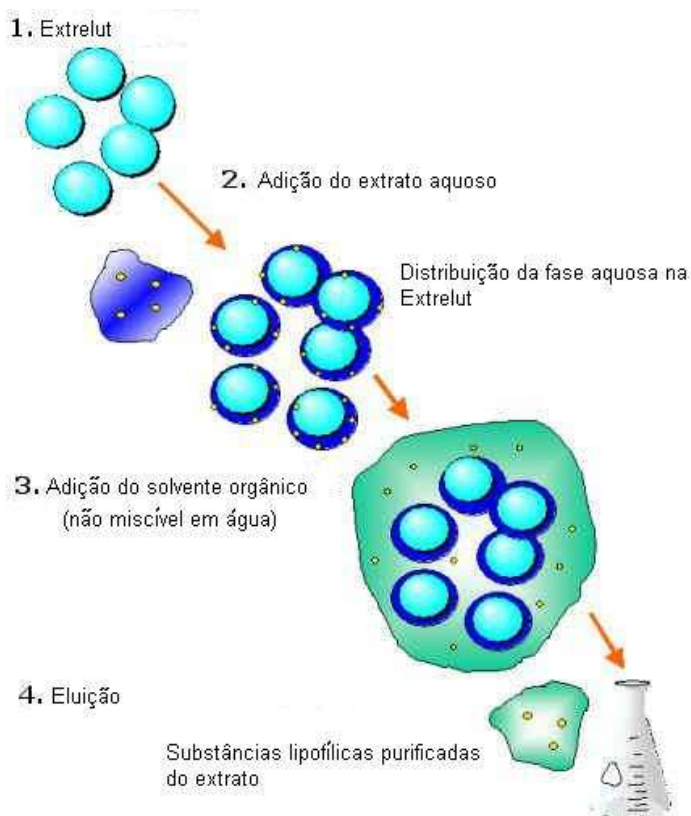


Figura 3: Processo de purificação por extração sólido-líquido utilizando Extrelut®.
Fonte: VWR... (2005a).

3.2.2 Purificação por extração em fase sólida

Cartuchos C_{18} são amplamente utilizados para purificação ou concentração de substâncias apolares ou moderadamente polares (LANGE et al., 2002; SANTOS et al., 2004). Este procedimento não é adequado para compostos muito polares; nestes casos, os trocadores iônicos são mais eficazes (BUSTO et al., 1995).

O uso de resinas de troca iônica na purificação de amostras oferece vantagens quando comparado com purificação por solventes, como preparação rápida das amostras, alta taxa de recuperação sem a formação de emulsão, alta precisão, economia de solventes e possibilidade de automatização de todo o processo (LIMA, 1999).

A troca iônica é baseada na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da resina. A afinidade distinta entre os íons da fase móvel e da resina é devido à diferença de cargas, sendo possível controlá-la utilizando fatores como pH e força iônica (COLLINS et al., 1997; LIMA, 1999). Os trocadores iônicos podem ser aniônicos, utilizados para reter substâncias com carga negativa, ou catiônicos para substâncias com carga positiva. A matriz destes trocadores pode ser inorgânica, como

alumina e bentonite, ou orgânica, como os copolímeros de estireno-divinilbenzeno e dextrano, sendo que a última tem sido mais utilizada devido a sua maior estabilidade em ampla faixa de pH, temperatura e entre solventes (COLLINS et al., 1997).

A troca aniônica tem sido utilizada na purificação de extratos de alimentos contendo aminas com o intuito de retirar principalmente aminoácidos e às vezes de compostos fenólicos (STARUSZKIEWICZ et al., 1977). A troca catiônica também é capaz de separar aminoácidos e aminas e tem sido mais utilizada na separação destas substâncias (VOIGT et al., 1974; INGLES et al., 1985; BUSTO et al., 1995; SIMON-SARKADI & HODOSI, 1995).

As resinas de troca catiônica do tipo arilsulfônica ($-\text{SO}_3^-$) são fortemente ácidas. São deste tipo as resinas Amberlite IR-120, Amberlite CG-120 e a Dowex-50. As resinas que contêm grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$), Amberlite CG-50 e Amberlite IRC-50, comportam-se como trocadoras de cátions fracamente ácidas (LIMA, 1999).

Na purificação com resinas de troca iônica, um ajuste inicial do pH do extrato é requerido, seguido de ativação da resina, lavagem, aplicação do extrato e etapas de eluição (MORET & CONTE, 1996).

Na purificação de histamina, tiramina e triptamina em amostras de queijo, VOIGT et al. (1974) usaram a resina Amberlite CGC-270 (fracamente ácida). O extrato aquoso foi passado através da coluna, a qual foi, em seguida, lavada com 50 mL de água destilada deionizada, sendo as aminas eluídas com 30 mL de HCl 1,0 mol/L. Para separação e quantificação destas aminas, foi utilizada a cromatografia de camada delgada.

SIMON-SARKADI & HODOSI (1995) utilizaram analisador de aminoácidos com resina de troca iônica Dowex-50 na purificação de amostras de queijo. Após aplicação de 10 mL do extrato ácido na coluna, esta foi lavada com 40 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 8,0), 40 mL de HCl 1,0 mol/L e as aminas eluídas com 15 mL de HCl 6 mol/L. Foram recuperadas tiramina, histamina, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina.

Outros tipos de substâncias podem ser utilizados na purificação de amostra, como a bentonite, mineral argiloso, composto principalmente de esmectita, que define suas propriedades físicas. É composta de sílica e alumina, dispersa prontamente em água em partículas muito pequenas e, geralmente, apresenta-se com carga negativa, que é balanceada com cátions adsorvidos, como sódio e cálcio. Apresenta comportamento tixotrópico (ocorre liquefação dos géis quando agitados e gelatinização em repouso), capacidade de adsorção e floculação. Como consequência, tem sido empregada em várias áreas, incluindo na indústria alimentícia, onde tem sido amplamente utilizada como

coadjuvante em tratamento de mostos e vinhos, clarificação de vinagres e sucos de frutas e também em processos de descoloração de óleos vegetais (BARBANTI et al., 1997).

O principal efeito da bentonite nos tratamentos de mostos e vinhos é a precipitação de proteínas pela adsorção e neutralização das cargas. Este efeito ocorre também com outros compostos nitrogenados, como aminoácidos e aminas, em proporções diferentes dependendo da estrutura da substância e das condições do meio (PUIG-DEU et al., 1999).

ESSINGTON (1994) estudou a adsorção da anilina e da toluidina em um tipo de bentonite. A adsorção da amina foi dependente do pH, sendo que o máximo de adsorção ocorreu quando o pH da solução se aproximava do pK_a da amina. Além disso, a adsorção da amina aumentou com a diminuição da força iônica.

Alguns estudos têm demonstrado a redução do teor de aminas bioativas em vinhos tratados com bentonite (JAKOB, 1968; DESSER & BANDION, 1985). Observando isto, a bentonite pode ter um potencial analítico na etapa de purificação de extratos para determinação de aminas.

3.3 DETECÇÃO DE AMINAS

A detecção por espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta (UV) permite a análise de tiramina e triptamina à 280 nm, feniletilamina à 254 nm e histamina à 215 nm. As aminas alifáticas não apresentam características estruturais que permitam sua detecção direta por espectroscopia no UV. Nestes comprimentos de onda, muitas outras substâncias apresentam absorção; então, apesar de ser possível a detecção no UV de algumas aminas bioativas sem a etapa de derivação, há a necessidade do uso de protocolos extensos de purificação das amostras para evitar interferentes ou métodos sofisticados de separação (JOOSTEN & OLIEMAN, 1986).

Poucos autores descreveram o uso da detecção no UV para determinação de aminas bioativas em alimentos sem a etapa de derivação. INGLES et al. (1978) analisaram tiramina em chocolate por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção a 280 nm, no entanto, a determinação de histamina não foi possível por este método. Por outro lado, CHANG et al. (1985) analisaram tirosina, histidina, triptofano, tiramina, histamina e triptamina em queijo por CLAE com par iônico com detecção a 220 nm. PELLATI et al. (2002) utilizaram a detecção a 220 nm para determinação de octopamina, sinefrina e tiramina em frutas cítricas. WHEATON & STEWART (1970)

utilizaram a cromatografia de troca catiônica para separação de tiramina e seu derivado metilado, sinefrina e octopamina de extratos de plantas e detecção a 238 nm.

A determinação das aminas bioativas por espectrofotometria de absorção molecular ou espectrofluorometria é possível pelas reações de derivação com ninidrina (INGLES et al., 1985; JOOSTEN & OLIEMAN, 1986; SIMON-SARKADI et al., 1994; STANDARA et al., 2000), cloreto de dansila (BUTS et al., 1995; PATTONO et al., 2000; MARTUSCELLI et al., 2005), *orto*-ftalaldeído (REUVERS et al., 1986, NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000); fluorescamina (TAYLOR et al., 1978; van HAASTER et al., 1993; LOWE et al., 1994); 9-fluorenilmetil cloroformato (HARDUF et al., 1988; AYGÜN et al., 1999; LOZANOV et al., 2004); cloreto de dabsila (KRAUSE et al., 1995; ROMERO et al., 2000), cloreto de benzoíla (KRÍZEK & PELIKÁNOVÁ, 1998; PALEOLOGOS et al., 2003; TSAI et al., 2005b); α -nitro- β -naftol (SEN, 1969; JALON et al., 1983; ULLA et al., 1989); dentre outros (YOU et al., 1999; KIRSCHBAUM et al., 2000; LIU et al., 2001; ZHANG & SUN, 2004; PATANGE et al., 2005). As estruturas químicas dos principais derivantes de aminas estão apresentadas na figura 4. As reações de derivação são importantes para permitir a detecção de substâncias, como a histamina, que não apresentam leitura confiável na região do UV em equipamentos comuns e aumentar a seletividade dos métodos de identificação e quantificação.

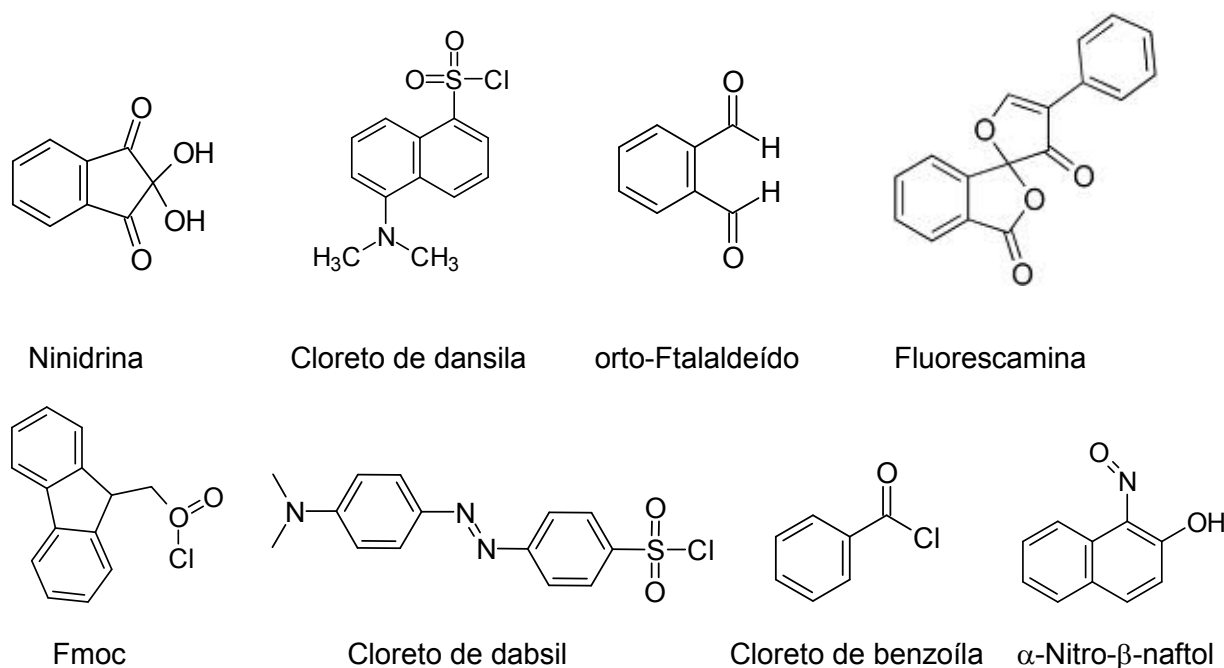


Figura 4: Estrutura química das principais substâncias utilizadas na derivação de aminas. Fmoc: fluorenilmetil cloroformato.

Ninidrina é um derivante amplamente utilizado na análise de aminoácidos e reage com grupos amino livres para formar um complexo lilás conhecido como lilás de Ruhemann com absorvância máxima a 570 nm (WHITE & HART, 1992; WALLACE & FOX, 1998), conforme mecanismo de reação apresentado na figura 5. Ninidrina é sensível à luz, ao oxigênio atmosférico e a mudanças de pH e temperatura e quando se oxida, a cor do derivado não desenvolve bem a 570 nm, mas a absorção a 440 nm permanece quase constante (WHITE & HART, 1992).

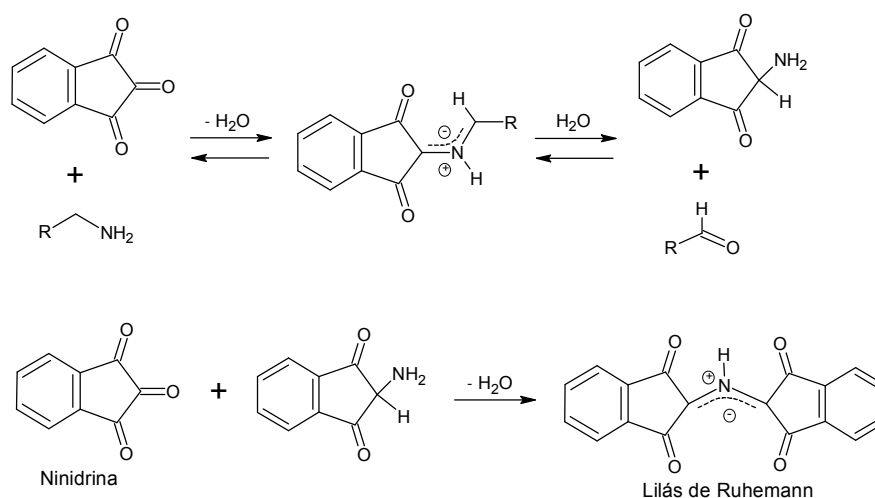


Figura 5: Reação da ninidrina com aminas primárias.

Fonte: PETROVSKAIA et al. (2001).

Cloreto de dansila (cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonila) tem sido amplamente utilizado na determinação de aminas bioativas. Este reage com grupos amino primário (figura 6) e secundário, imidazóis, fenóis e alguns álcoois; no entanto, nas condições de pH usualmente utilizadas na análise de aminas e aminoácidos a reação com fenóis e álcoois é lenta (SEILER, 1970). Os derivados de dansila exibem uma intensa fluorescência amarela e podem ser detectados em pequenas quantidades utilizando comprimento de onda de excitação na faixa de 350 a 360 nm e emissão entre 495 e 510 nm.

Em meio alcalino contendo um agente redutor, como mercaptoetanol, *orto*-ftalaldeído (OPA) reage com grupo amino primário (figura 7), formando um composto fluorescente com comprimento de onda de excitação de 330 a 360 nm e emissão de 425 a 466 nm (LERKE & BELL, 1976; REUVERS et al., 1986; SALAZAR et al., 2000). Este composto também pode ser detectado por espectrofotometria a 330 - 340 nm (WHITE & HART, 1992; CONCA et al., 2001). A vantagem de utilizar o OPA ao invés do cloreto de

dansila (DnsCl) é a seletividade do OPA-mercaptoetanol por aminas primárias (REUVERS et al., 1986). No entanto, o derivado formado com histamina e outras aminas é estável por apenas 1 h (LERKE & BELL, 1976; STARUSZKIEWICZ et al., 1977).

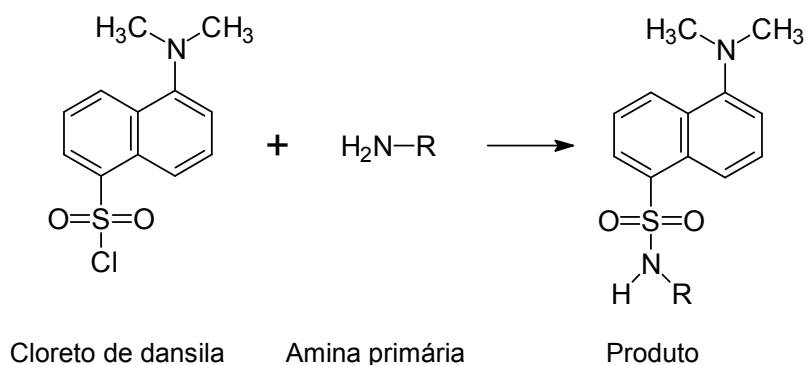


Figura 6: Reação do cloreto de dansila com aminas primárias.

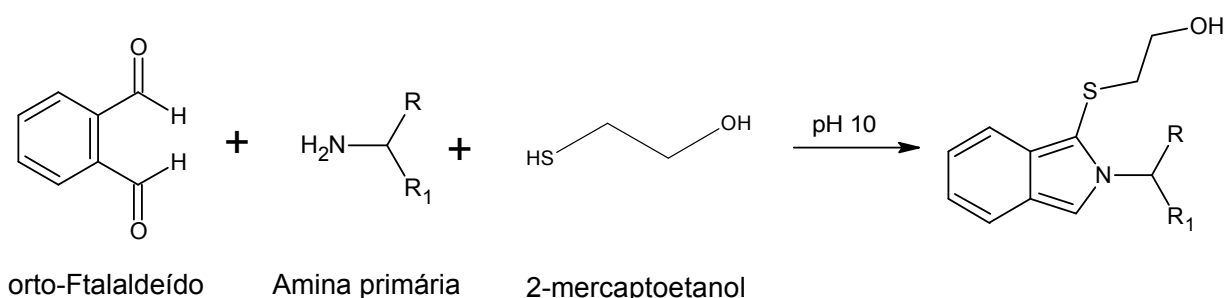


Figura 7: Reação de orto-ftalaldeído e mercaptoetanol com aminas primárias.
Fonte: WHITE & HART (1992).

Fluorescamina reage com compostos que possuem grupo amino primário quase instantaneamente a temperatura ambiente e em solução aquosa com pH 7,5 - 9,0. Os derivados formados apresentam excitação a 360 nm e emissão a 440 nm, e são estáveis por uma semana (van HAASTER et al., 1993; LOWE et al., 1994).

Fluorenilmetil cloroformato (FMOC) foi originalmente utilizado na prática analítica como um derivante fluorescente na análise de aminoácidos e atualmente é utilizado também na análise de vários compostos que possuem a função amino (LOZANOV et al., 2004). FMOC é capaz de reagir com aminas primárias e secundárias (WHITE & HART, 1992) e os derivados formados apresentam excitação a 265 nm e emissão a 310 nm (AYGÜN et al., 1999).

Também é possível utilizar na análise de aminas detecção amperométrica (DRAISCI et al., 1998; PASTORE et al., 2005), condutimétrica (REY & POHL, 2003; CINQUINA et al., 2004; KVASNICKA & VOLDRICH, 2006) ou eletroquímica (SADAIN & KOROPCHAK, 1999; YASHIN & YASHIN, 2004).

3.4 SEPARAÇÃO E ANÁLISE DE AMINAS

Não existe uma técnica única para a determinação de aminas em alimentos. Cromatografia em papel (PISANO et al., 1961; SATO et al., 1970; SEILER, 1986), cromatografia em camada delgada (NAGUIB et al., 1995; EL-SAYED, 1996; LAPA-GUIMARÃES & PICKOVA, 2004), cromatografia de troca-iônica (ZEE et al., 1981; STANDARA et al., 2000; SACCANI et al., 2005), cromatografia gasosa (SEN, 1969; BAKER et al., 1987; ANTOINE et al., 2002); cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa (LOWE et al., 1994; TAMIN et al., 2002) ou com par iônico (REUVERS et al., 1986; IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993; VALE & GLÓRIA, 1997; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000); eletroforese capilar (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 1999; LANGE et al., 2002; KVASNICKA & VOLDRICH, 2006); e ensaios imunoenzimáticos (SERRAR et al., 1995; AYGÜN et al., 1999; MARCOBAL et al., 2005) são alguns métodos que vêm sendo utilizados para separar, identificar e quantificar aminas em alimentos. Os métodos diferem na sensibilidade, seletividade, facilidade de preparo da amostra, velocidade de separação e custo.

Há alguns anos atrás, trabalhos foram desenvolvidos para separação de poliaminas por cromatografia em papel (PISANO et al., 1961; SATO et al., 1970; SEILER, 1986). Embora esta técnica seja específica, ultimamente não tem sido muito utilizada por ser demorada, semi-quantitativa e imprecisa a baixas concentrações (SEN, 1969). Entretanto, pode ainda ser útil para determinações qualitativas, em locais nos quais equipamentos mais sofisticados não estão disponíveis.

Alguns autores sugerem o uso de cromatografia em camada delgada para a determinação de aminas em alimentos (SHALABY, 1994; NAGUIB et al., 1995; EL-SAYED, 1996; LAPA-GUIMARÃES & PICKOVA, 2004). Nessa técnica, a amina pode ser separada, identificada e quantificada semelhante à cromatografia em papel. A maior dificuldade na aplicação prática da cromatografia de camada delgada e de papel baseia-se na alta polaridade das poliaminas, o que torna a sua recuperação, em soluções contendo sais, extremamente difícil. Além disto, os aminoácidos e as aminas são eluídos

juntos, sendo que a separação não é facilmente conseguida por um sistema unidimensional (SEILER, 1986).

Os ensaios imuno-enzimáticos utilizam geralmente procedimentos rápidos e envolvem etapas de extração da amina, reação enzimática e determinação colorimétrica. No entanto, os kits comercializados são caros, a determinação é para apenas uma amina, geralmente histamina, e a determinação pode apresentar interferência das outras aminas (SERRAR et al., 1995; AYGÜN et al., 1999; SATO et al., 2005).

Atualmente, os métodos mais utilizados envolvem a cromatografia líquida de troca iônica ou a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, que são mais seletivos e sensíveis, permitindo a determinação de pequenas quantidades de aminas.

3.4.1 Cromatografia de troca iônica

Em vários trabalhos descritos na literatura, as aminas são separadas e quantificadas por cromatografia de troca iônica utilizando-se o analisador de aminoácidos, que é um cromatógrafo líquido com coluna de troca iônica e com sistema de detecção e quantificação. A detecção e quantificação são geralmente realizadas após reação com ninidrina (NAKAMURA et al., 1979; ZEE et al., 1981; SIMON-SARKADI et al., 1994). Mas pode-se fazer também a derivação pós-coluna com OPA na presença de 2-mercaptoetanol ou com fluorescamina, os quais aumentam a sensibilidade do método (SEILER, 1986).

Devido a grande capacidade das resinas de troca iônica, é possível aplicar amostras sem pré-purificação ou concentração (SEILER, 1986). Isto, segundo alguns autores, torna o método de análise de aminas bioativas em alimentos utilizando troca iônica, uma técnica mais simples quando comparada a outros métodos, pois requer menor preparo da amostra (HALÁSZ et al., 1994; SIMON-SAKARDI & HODOSI, 1995). Além disto, esta técnica tem capacidade de separar um grande número de aminas com razoável sensibilidade e precisão (ZEE et al., 1983).

Utilizando analisador de aminoácidos, derivação com ninidrina e detecção espectrofotométrica a 570 nm, onze aminas foram determinadas em amostras de carnes frescas e processadas (ZEE et al., 1983) e de queijo (ZEE et al., 1985). As aminas foram eluídas da coluna de troca catiônica C-4 com sistema de eluição com cinco soluções tampão com valores de pH 5,55; 5,65; 6,10; 9,60 e 12,75. Segundo os autores, este método não foi limitado pelo número de aminas presentes ou afetado por contaminantes.

A cromatografia de troca iônica foi utilizada por INGLES et al. (1985) na determinação de aminas em amostras de queijo, peixe, iogurte, chocolate, bebidas e produtos fermentados. O método empregou três etapas de eluição com tampões citrato de sódio e borato de sódio e derivação com ninidrina. Segundo os autores, o procedimento é confiável, porém, o tempo de corrida de cada amostra foi de aproximadamente seis a oito horas.

A troca iônica foi utilizada também na análise de histamina, cadaverina e putrescina em amostras de sardinha. As aminas foram separadas em coluna sulfônica (contra-íon Na^+) e eluídas com dois sistemas de tampão citrato trissódio pH 5,5 e 5,7 (ABABOUCHE et al., 1991).

BARÁTH et al. (1995) compararam a separação de aminas em analisador de aminoácidos com derivação pré-coluna com ninidrina, e CLAE também com derivação pré-coluna com ninidrina, em amostras de carne e cerveja. Os autores concluíram que o método de troca iônica foi mais simples e a reprodutibilidade melhor que o método por CLAE. Entretanto, o tempo de análise foi maior na troca iônica. Atualmente os métodos de cromatografia de troca iônica conseguem otimizar as condições para análises com tempo inferior a 30 min (SADAIN & KOROPCHAK, 1999; CONCA et al., 2001; REY & POHL, 2003).

3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A análise de aminas bioativas em alimentos por CLAE, além de oferecer a vantagem de separação e quantificação simultânea das aminas, permite maior rapidez e sensibilidade.

Vários tipos de coluna podem ser usados na separação de aminas bioativas pela CLAE. As mais utilizadas são C_{18} (VALE & GLÓRIA, 1997) e C_8 (IBE et al., 1991; LOWE et al., 1994). A separação pode ser realizada por sistema de eluição isocrático, que normalmente não é capaz de separar todas as aminas, ou gradiente, utilizando como solventes água:metanol, água:acetonitrila e água:tampão fosfato (LIMA, 1999). Além disso, quase todos os tipos de detecção podem ser acoplados ao sistema de CLAE, incluindo espectrofotométrica no ultravioleta-visível (UV-VIS), fluorescência e eletroquímica (BOUCHEREAU et al., 2000).

A CLAE por fase reversa é considerada a técnica mais adequada para análise de aminas em alimentos ao se utilizar derivação pré-coluna com cloreto de dansila (MORET & CONTE, 1996). VASUNDHARA et al. (1998) determinaram seis aminas, entre elas a

histamina e a tiramina, por CLAE em fase reversa, em amostras de queijos, produtos cárneos, chocolates e vinhos. Foram utilizados derivação pré-coluna com cloreto de dansila e eluição com gradiente linear de metanol e água.

A introdução de contra-íon como o sal sódico dos ácidos hexanosulfônico, heptanosulfônico ou octanosulfônico na fase móvel utilizada na CLAE de fase reversa é denominado CLAE com par iônico e melhora a separação das aminas. Isto ocorre devido à neutralização das aminas, aumentando o seu tempo de retenção na coluna (LIMA, 1999).

VALE & GLÓRIA (1998) e NOVELLA-RODRÍGUEZ et al. (2000) determinaram 10 aminas em queijos utilizando, como método de separação, a CLAE de fase reversa com par iônico, coluna μ Bondapak C₁₈ e gradiente de eluição. Os primeiros autores utilizaram tampão acetato em pH 5,0, metanol e acetonitrila como eluentes e os segundos autores, tampão acetato em pH 5,3 e acetonitrila. As aminas foram quantificadas espectrofluorometricamente após derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído.

A CLAE com par iônico tem sido utilizada com sucesso na determinação de aminas em queijo e vários outros produtos. Esta tem sido a técnica de escolha e também a recomendada pela Comunidade Européia para análise de aminas em peixes (VALE & GLÓRIA, 1997; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000; SANTOS et al., 2003). Entretanto, os recursos necessários para este método de análise não estão disponíveis em todos os laboratórios. Desta forma, são necessários o desenvolvimento e a validação de um procedimento analítico sensível e econômico para a determinação destas substâncias, utilizando etapas simples de extração, purificação e quantificação em espectrofotômetro de absorção molecular, mesmo que seja apenas um teste preliminar, semi-quantitativo, tipo *screening*.

CAPÍTULO I

PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJO RALADO

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo identificar o perfil e teores de histamina, tiramina e outras aminos bioativas em diferentes marcas e tipos de queijo ralado. Treze marcas de queijo ralado foram adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG (2005-2006) e as aminos bioativas foram determinadas por CLAE com par iônico. Foi detectada a presença das dez aminos bioativas investigadas. Serotonina, agmatina, espermidina, triptamina, feniletilamina e espermina estavam presentes em baixos teores. Putrescina e cadaverina foram encontradas em 87% e 100% das amostras analisadas, em teores de até 30,20 e 85,05 mg/100 g, respectivamente. Histamina e tiramina foram detectadas em teores de até 78,27 e 34,42 mg/100 g, respectivamente. Destas amostras, 62% poderiam causar intoxicação pela histamina. Em 56% das amostras os teores de tiramina excederam 6 mg/100 g podendo causar enxaqueca, e em 36% os teores encontrados foram acima de 10 mg/100 g podendo provocar crise hipertensiva em indivíduos em tratamento com inibidores da monoaminoxidase. Comparando-se os teores de aminos nos queijos analisados nos períodos de 2005 a 2006 e 1999 a 2001, apesar da redução dos teores máximos de histamina e tiramina, não houve melhoria na qualidade dos queijos ralados, visto que 62% das amostras poderiam causar intoxicações. Desta forma, os teores de tiramina e histamina em queijos ralados deveriam ser um critério de qualidade higiênico-sanitário. A partir dos resultados da correlação, quando a análise de histamina e tiramina separadamente não for viável, é possível utilizar os teores de aminos biogênicas, aminos totais ou da soma de histamina e tiramina para avaliar a aptidão do queijo utilizado como matéria-prima para queijo ralado.

Palavras-chave: Queijo ralado, aminos bioativas, histamina, tiramina, qualidade.

1 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo caracterizar o queijo ralado em relação às aminas bioativas. Os objetivos específicos foram (i) determinar os tipos e teores de aminas presentes em amostras de queijos ralados obtidos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG no período de 2005 a 2006; (ii) comparar estes dados com aqueles obtidos para queijo ralado comercializado em 1999-2001; e (iii) correlacionar os teores de histamina e tiramina com os teores totais de aminas e de aminas biogênicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

Amostras de queijo ralado com denominação de origem certificada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) foram adquiridas ao acaso, no período de março de 2005 a maio de 2006 em grandes redes de supermercados de Belo Horizonte, MG. Treze marcas de queijo ralado (três lotes com 100 g cada) foram analisadas quanto aos teores de aminas bioativas. Todas as análises foram feitas em duplicata, sendo respeitado o prazo de validade.

2.1.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto os solventes utilizados na CLAE (acetonitrila e metanol), que foram de grau cromatográfico. A água ultrapura foi obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Os padrões das aminas bioativas histamina (HIM, dicloridrato), tiramina (TIM, cloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), espermidina (EPD, tricloridrato), agmatina (AGM, complexo sulfato creatinina), putrescina (PUT, dicloridrato), cadaverina (CAD, dicloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato), triptamina (TRM) e 5-hidroxitriptamina

(serotonina – SRT, cloridrato) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) com pureza acima de 99%. *orto*-Ftalaldeído e o antiespumante Brij-35 também foram adquiridos da Sigma.

2.1.3 Preparo da solução padrão de aminas

As aminas foram pesadas considerando-se o peso da base livre e foram dissolvidas em ácido clorídrico 0,1 mol/L, obtendo-se soluções individuais de 1,0 mg de cada amina/mL. Um mililitro de cada amina foi transferido para um balão volumétrico de 10,00 mL para preparo da solução contendo 0,1 mg/mL de cada amina. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição com HCl 0,1 mol/L de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 10,0 mL da solução com as dez aminas em balão volumétrico de 100,00 mL, obtendo-se as concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 10,0 µg/mL. Estas soluções foram utilizadas para o preparo da curva padrão externa que foi utilizada para quantificar as aminas.

2.2 MÉTODOS DE ANÁLISE

2.2.1 Extração das aminas bioativas

As aminas foram extraídas por adição de 15,0 mL da solução de HCl 1,0 mol/L a cerca de 5,0000 g de amostra de queijo ralado. As amostras foram homogeneizadas em mesa agitadora orbital a 250 rpm, por 10 min, e centrifugadas a 11.180 g a 4 °C, por 21 min. Em seguida, foram filtradas em papel de filtro qualitativo. A extração foi repetida por mais duas vezes, os filtrados foram combinados e o volume foi completado para 50,00 mL.

2.3.1 Separação e determinação de aminas bioativas por CLAE com par iônico

Todos os extratos obtidos foram filtrados em membranas de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro, tipo HAWP (Millipore Corp. Milford, MA, EUA). As aminas foram separadas por CLAE de fase reversa com par iônico e quantificadas fluorometricamente a 340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente, após derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído.

Foi utilizado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu, modelo LC-10 AD (Kyoto, Japão), com câmara de mistura à baixa pressão; conjunto de lavagem

automática de pistão; injetor automático (modelo LC-10 AD); detector espectrofluorométrico (modelo RF-551, Shimadzu); e uma unidade de controle CBM-10 AD conectada a um computador. O sistema de derivação pós-coluna foi montado com uma câmara de mistura (volume morto igual a zero), instalada entre a saída da coluna e o detector; um tubo de teflon (sob abrigo da luz) de 2 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro conectado entre a câmara de mistura e o detector e uma bomba LC-10 AD (Shimadzu, Kioto, Japão).

Foi utilizada coluna μ Bondapak C₁₈ em fase reversa de 3,9 x 300 mm, tamanho das partículas da resina de 10 μ m (Waters, Milford, MA, EUA), pré-coluna μ Bondapak C₁₈ (Waters) e sistema gradiente de eluição em ambiente com temperatura controlada (21 + 1 °C). A fase móvel utilizada foi constituída de dois solventes: A - tampão acetato 0,2 mol/L contendo octanossulfonato de sódio 15 mmol/L e pH ajustado para 4,9 com ácido acético e B - acetonitrila. As fases móveis foram filtradas em membranas (47 mm de diâmetro e 0,45 μ m de tamanho de poro) tipo HAWP para solvente aquoso e HVWP para solvente orgânico (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/min e o gradiente de eluição dos solventes foi: 0,01 a 13 min a 11 % de B, 19 min a 30%, 24 min 11% e término a 50 min.

A solução derivante foi preparada dissolvendo-se 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio em 500 mL de água ultra-pura, pH ajustado para 10,5 com hidróxido de potássio. A esta solução foram adicionados 0,2 g de o-ftalaldeído dissolvido em 3 mL de metanol, 1,5 mL de Brij-35 (antiespumante) e 1,5 mL de mercaptoetanol, conforme descrito por GLÓRIA & DAESCHEL (1995). A solução derivante foi preparada diariamente, mantida sob abrigo da luz e bombeada à câmara de mistura a um fluxo de 0,4 mL/min.

A identificação das aminas foi feita por comparação do tempo de retenção dos padrões com o das amostras e a confirmação, pela adição de solução padrão contendo a amina suspeita à amostra. A quantificação das aminas foi feita por interpolação direta nas curvas analíticas com coeficientes de determinação superiores a 0,9992. Para confirmação da reprodutibilidade da análise durante o dia e também entre os dias, padrões externos na concentração de 4,0 μ g/mL das 10 aminas bioativas foram analisados diariamente a cada quatro amostras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJOS RALADOS

De acordo com a descrição dos ingredientes nos respectivos rótulos, as amostras foram agrupadas em queijo parmesão ralado (QPR), queijo tipo parmesão ralado (QTPR) e queijo ralado (QR). Nas amostras denominadas QPR (7 marcas – A a G), o ingrediente era o queijo parmesão; nas amostras QTPR (3 marcas – H a J), os ingredientes eram leite, fermento láctico, coalho e sal; e nas amostras QR (3 marcas – K a M), os ingredientes eram misturas respectivamente de queijos fundidos e parmesão; sbrinz, reino, tilsit, prato e parmesão; queijo tropical e mussarela.

Os teores de aminos bioativas encontradas nas diferentes marcas de queijo parmesão ralado, queijo tipo parmesão ralado e queijo ralado estão indicados na tabela I.1. Todas as aminos bioativas pesquisadas foram detectadas nas amostras analisadas com teores totais variando de 5,27 a 141,51 mg/100 g (figura I.1). Entre as marcas de queijo parmesão ralado, foi observada a maior diferença dos teores de aminos.

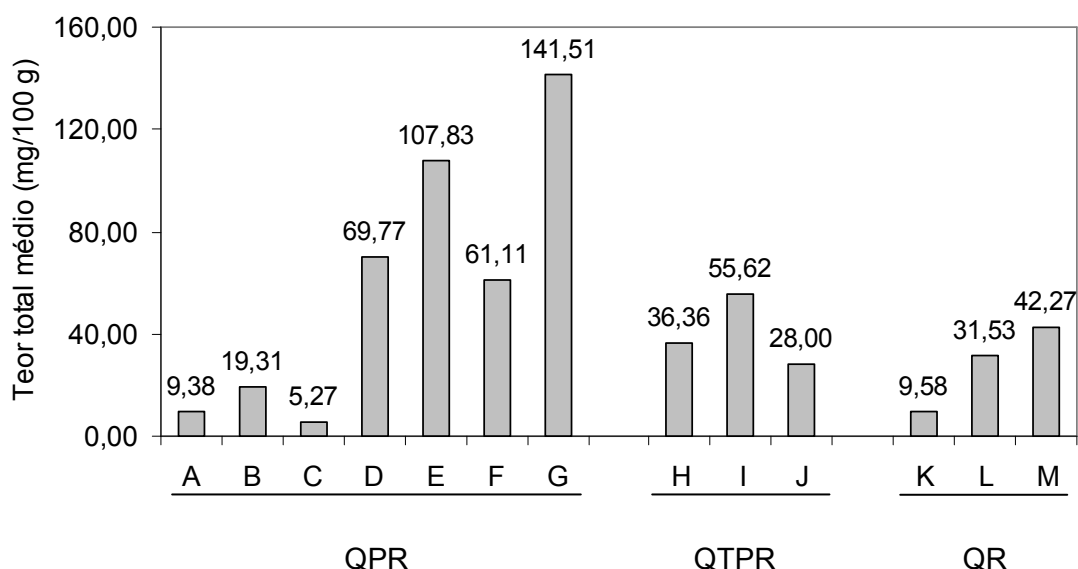


Figura I.1: Teores totais de aminos bioativas de amostras de queijo ralado coletadas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, no período de março de 2005 a maio de 2006. QPR – queijo parmesão ralado, QTPR – queijo tipo parmesão ralado, QR – queijo ralado.

Tabela I.1: Teores de aminos bioativas em queijo parmesão ralado, queijo tipo parmesão ralado e queijo ralado

Amostra	Teores de aminos bioativas (mg/100 g)									
	HIM	TIM	EPM	EPD	AGM	PUT	CAD	FEM	TRM	SRT
Queijo Parmesão										
A min	0,08	1,10	0,06	0,05	nd	nd	0,15	0,29	nd	nd
max	0,40	3,92	0,28	0,36	0,76	0,06	0,23	1,00	8,62	0,49
media	0,21	2,91	0,15	0,17	0,32	0,03	0,20	0,70	4,45	0,23
B min	7,72	2,24	0,09	0,05	0,12	nd	0,23	nd	nd	nd
max	15,63	10,73	0,41	0,17	0,40	2,51	1,51	0,34	1,21	nd
media	10,60	5,65	0,25	0,10	0,22	1,18	0,93	0,13	0,26	0
C min	1,55	0,27	0,07	0,02	nd	nd	0,11	nd	nd	nd
max	5,30	1,72	0,54	0,10	0,26	0,27	0,66	0,13	1,18	nd
media	3,03	1,03	0,25	0,06	0,08	0,07	0,32	0,04	0,39	0
D min	13,30	9,05	0,07	0,05	0,10	5,84	4,41	0,24	0,48	0,13
max	41,73	17,07	0,10	0,07	0,48	14,48	29,86	1,21	3,22	0,21
media	30,27	12,21	0,08	0,06	0,25	9,93	14,06	0,62	2,10	0,17
E min	31,11	12,45	nd	nd	nd	3,33	9,79	0,09	nd	nd
max	78,27	34,42	4,28	nd	0,14	16,09	34,81	3,08	2,36	0,10
media	48,00	24,28	1,58	0	0,04	9,74	22,17	1,08	0,92	0,02
F min	15,55	13,41	nd	nd	0,11	2,93	11,09	0,73	nd	nd
max	26,10	22,80	0,08	0,06	1,24	8,37	19,01	1,99	1,41	0,12
media	21,32	16,98	0,04	0,03	0,48	5,40	14,74	1,45	0,61	0,06
G min	16,70	12,54	nd	nd	nd	18,69	17,98	0,43	nd	nd
max	46,96	24,71	0,08	0,05	0,12	30,20	85,05	1,53	0,41	nd
media	35,92	20,08	0,05	0,03	0,11	25,43	58,76	1,03	0,13	0
Queijo Tipo Parmesão										
H min	8,77	4,64	nd	0,02	nd	1,91	5,08	0,21	nd	nd
max	12,07	11,21	0,41	0,51	0,30	8,09	18,31	1,16	8,61	0,28
media	11,08	6,85	0,15	0,21	0,14	4,14	9,76	0,49	3,38	0,15
I min	7,90	4,99	0,08	0,14	0,20	4,80	5,23	0,37	nd	nd
max	19,88	22,32	0,66	0,43	0,28	16,41	36,82	2,97	7,08	0,23
media	12,12	11,54	0,36	0,24	0,23	8,77	16,62	1,28	4,35	0,11
J min	4,97	4,72	0,07	0,05	0,17	2,23	1,16	0,52	nd	0,10
max	12,67	6,96	0,37	0,46	0,44	4,98	13,23	1,43	5,03	0,57
media	7,76	5,54	0,25	0,23	0,29	3,32	6,36	0,89	3,03	0,33
Queijo ralado										
K min	0,22	1,70	nd	0,05	nd	nd	0,20	0,18	nd	nd
max	0,38	4,32	0,11	0,45	0,24	0,04	0,78	0,89	10,35	0,46
media	0,33	2,69	0,06	0,22	0,13	0,01	0,39	0,57	4,92	0,26
L min	15,32	3,50	nd	0,04	nd	1,96	0,86	0,05	nd	nd
max	25,69	10,06	0,30	0,08	0,18	4,13	2,59	0,29	2,02	0,12
media	18,93	6,55	0,09	0,06	0,08	3,11	1,75	0,13	0,77	0,06
M min	10,88	8,99	nd	0,05	0,14	4,28	7,52	0,87	0,38	nd
max	12,37	11,50	0,08	0,06	0,64	9,33	16,19	1,45	2,48	0,11
media	11,88	10,37	0,06	0,06	0,31	6,20	11,27	1,14	0,96	0,02

HIM: histamina; TIM: tiramina; EPM: espermina; EPD: espermidina; AGM: agmatina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEM: feniletilamina; TRM: triptamina; SRT: serotonina. Min: mínimo; max: máximo; nd: não detectado (limite de detecção: HIM = 0,05 mg/100 g; TIM = 0,01 mg/100 g; EPM = 0,05 mg/100 g; EPD = 0,02 mg/100 g; AGM = 0,10 mg/100 g; PUT = 0,01 mg/100 g; CAD = 0,02 mg/100 g; FEM = 0,05 mg/100 g; TRM = 0,20 mg/100 g; SRT = 0,10 mg/100 g).

Histamina foi detectada em todas as amostras em teores de 0,08 a 78,27 mg/100 g nas marcas de queijo parmesão ralado; de 4,97 a 19,88 mg/100 g nas de queijo tipo parmesão ralado; e de 0,22 a 25,69 mg/100 g nas de queijo ralado (tabela I.1 e figura I.2). Em 62% das amostras, o teor dessa amina excedeu o limite tóxico, estando estas inadequadas ao consumo humano por representarem risco à saúde (> 10 mg/100 g). Estes teores de histamina podem causar sintomas cutâneos, como urticária, edema, rubor, inflamação localizada; distúrbios gastrintestinais, como náusea, vômito, diarreia; hemodinâmicos (hipotensão) e neurológicos, como cefaléia, palpitação, zumbidos (GOODMAN et al., 2003; GLÓRIA, 2005).

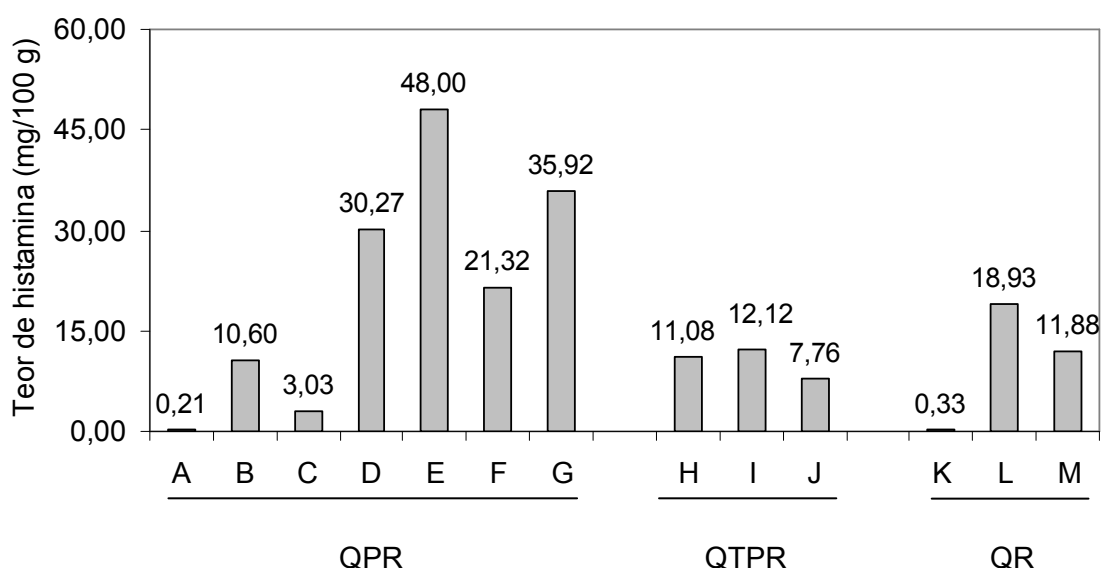


Figura I.2: Teores médios de histamina de amostras de queijo ralado coletadas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, no período de março de 2005 a maio de 2006. QPR – queijo parmesão ralado, QTPR – queijo tipo parmesão ralado, QR – queijo ralado.

A tiramina foi detectada em 100% das amostras em teores de 0,27 a 34,42 mg/100 g nas marcas de queijo parmesão ralado; de 4,64 a 22,32 mg/100 g nas de queijo tipo parmesão ralado; e de 1,70 a 11,50 mg/100 g nas de queijo ralado (tabela I.1, e figura I.3). Em 56% das amostras, a tiramina foi encontrada em teores acima de 6 mg/100 g podendo causar enxaqueca, e crise hipertensiva e hemorragia intracraniana em indivíduos em tratamento com medicamentos inibidores da monoaminoxidase (GLÓRIA, 2005). Em 36%, os teores encontrados foram superiores a 10 mg/100 g.

Além disso, houve elevada variação nos teores de histamina e tiramina entre os lotes de várias marcas, sugerindo que não há padronização dos procedimentos que interferem na formação das aminas. Também houve variação nos teores das aminas entre as diferentes marcas de um mesmo tipo de queijo.

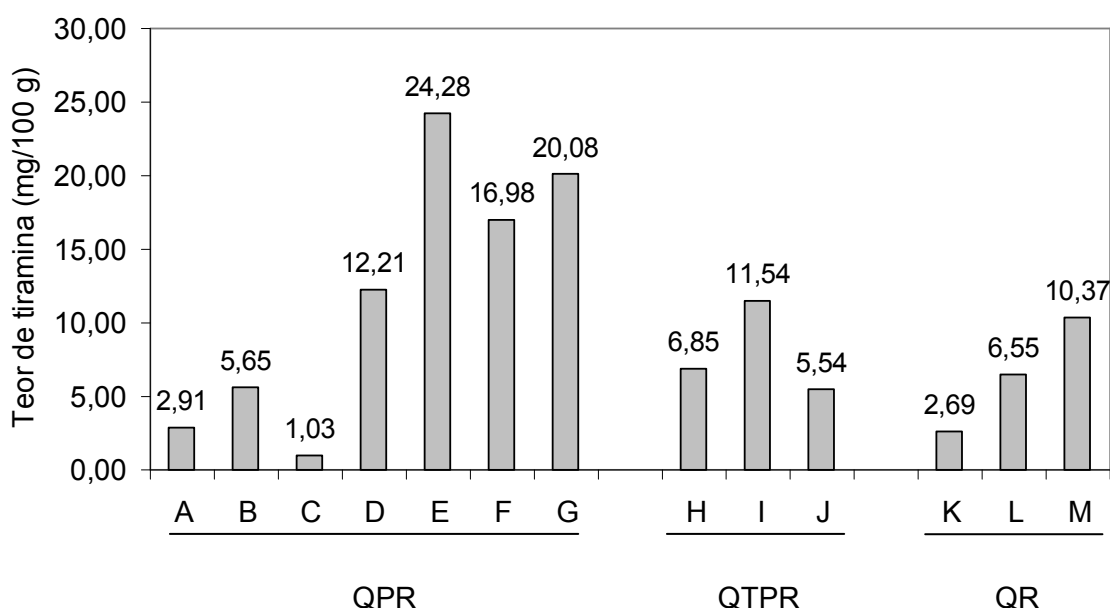


Figura I.3: Teores médios de tiramina de amostras de queijo ralado coletadas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, no período de março de 2005 a maio de 2006. QPR – queijo parmesão ralado, QTPR – queijo tipo parmesão ralado, QR – queijo ralado.

As aminas freqüentemente encontradas no leite - agmatina, espermidina e espermina (NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000; SANTOS et al., 2003) - foram detectadas em baixos teores (≤ 1 mg/100 g), exceto espermina em um lote da marca E (tabela I.1). Os teores da amina fenólica feniletilamina e das indolaminas serotonina e triptamina também foram considerados baixos (tabela I.1).

As diaminas putrescina e cadaverina foram detectadas em 87% e 100% das amostras em teores de 0,04 a 30,20 e de 0,11 a 85,05 mg/100 g, respectivamente (tabela I.1). Estes teores elevados podem estar associados a condições higiênicas inadequadas da matéria-prima utilizada no preparo do queijo ralado, pois a formação de putrescina e cadaverina ocorre por ação de descarboxilases de microrganismos (HALÁSZ et al., 1994; MEDINA et al., 2003).

O acúmulo de putrescina e cadaverina também deve ser evitado, visto que podem potencializar o efeito tóxico da histamina por inibir a ação das enzimas DAO

(diaminoxidase) e HMT (histamina N-metiltransferase) responsáveis pelo seu metabolismo (HUI & TAYLOR, 1985; SILLA-SANTOS, 1996). Além disso, a putrescina e cadaverina podem ainda reagir com íon nitrito em condições ácidas formando nitrosaminas, que são substâncias potencialmente carcinogênicas (HALÁSZ et al., 1994; MEDINA et al., 2003).

3.2 COMPARAÇÃO DOS TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJOS RALADOS PRODUZIDOS EM DIFERENTES PERÍODOS

Dentre as 13 marcas de queijo ralado avaliadas neste estudo, nove foram analisadas no período de dezembro de 1999 a maio de 2001 no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG por PIMENTEL (2001), além de outras nove marcas não avaliadas aqui. De forma similar ao encontrado neste estudo, espermidina, espermina, agmatina, feniletilamina, triptamina e serotonina estavam presentes em baixos teores. Putrescina e cadaverina foram encontradas em 89 e 100% das amostras, em teores de até 11,82 e 42,04 mg/100 g, respectivamente. Histamina e tiramina foram detectadas em teores de até 115,44 e 126,35 mg/100 g, respectivamente. Destas amostras, 50% poderiam causar intoxicação pela histamina. Em 66% das amostras, os teores de tiramina excederam 6 mg/100 g e, em 50%, os teores foram superiores a 10 mg/100 g.

Comparando-se as marcas estudadas nos dois períodos, observa-se que em média, os teores máximos de histamina, tiramina e teores totais diminuíram. Entretanto, esta redução ocorreu principalmente devido a marca D (figura I.4). Analisando as outras marcas, observa-se que algumas apresentaram um aumento significativo nos teores médios e outras, uma redução.

A ocorrência de tiramina e histamina acima da dose potencialmente tóxica permaneceu elevada nos dois períodos. Além disso, avaliando o teor total de aminas biogênicas, i.e., a soma dos teores de tiramina, histamina, putrescina, cadaverina, feniletilamina e triptamina, 38% das amostras analisadas no período de 2005 a 2006 tinham concentrações superiores a 40 mg/100 g, considerada potencialmente tóxica por SHALABY (1996) e 15% excederam 90 mg/100 g. Entre as amostras analisadas no período de 1999 a 2001, a ocorrência de amostras com teores superiores a 40 mg/100 g foi de 26% e superiores a 90 mg/100 g foi de 12%.

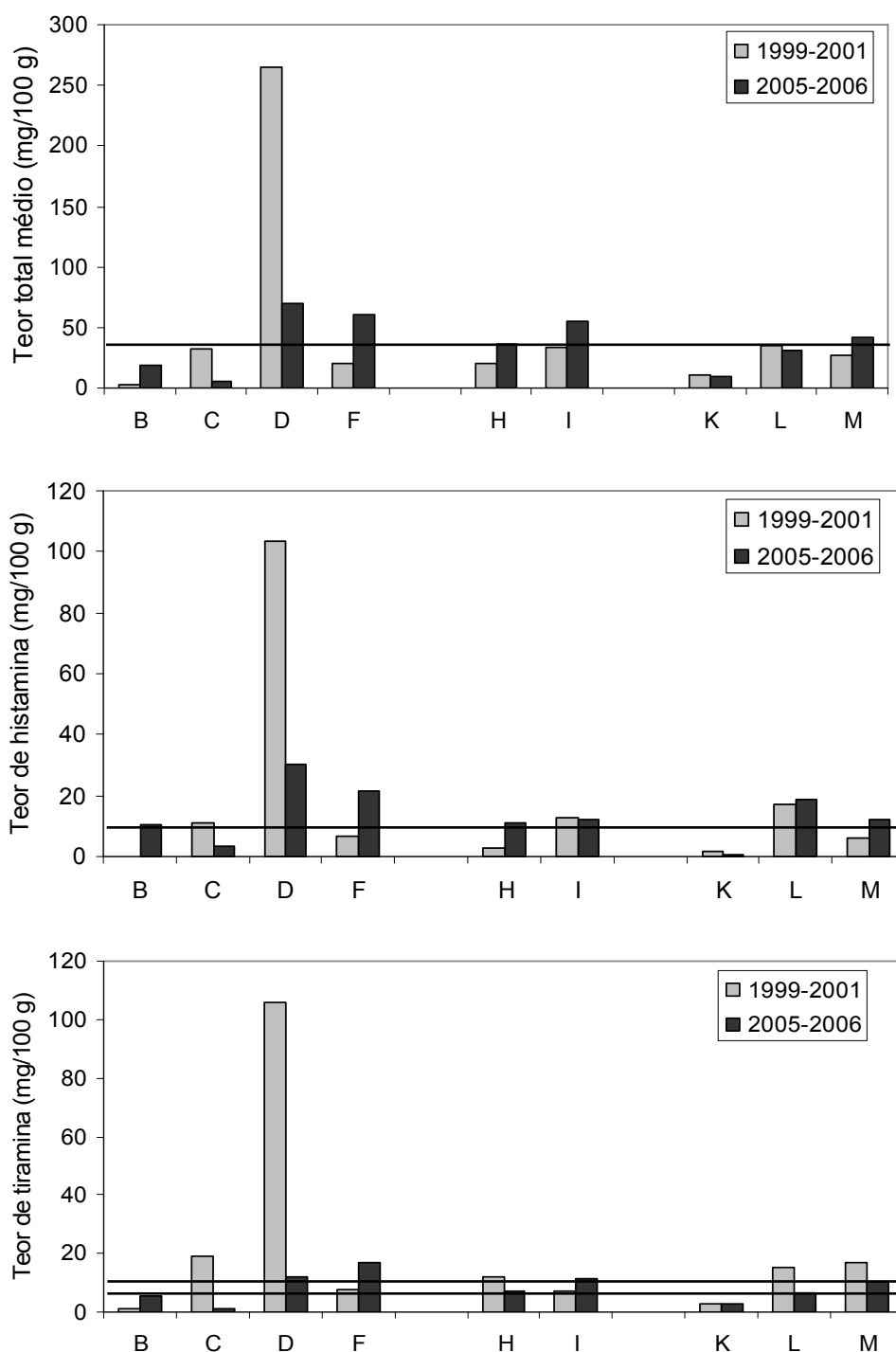


Figura I.4: Teores totais, de histamina e de tiramina de amostras de queijo ralado coletadas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, nos períodos de dezembro de 1999 a maio de 2001 e de março de 2005 a maio de 2006.

As barras representam os limites tóxicos das aminas totais (40 mg/100 g), histamina (10 mg/100 g) e tiramina, valor geral (10 mg/100 g) e valor para indivíduos em tratamento com inibidores de monoaminooxidase (6 mg/100 g).

3.3 CORRELAÇÃO DOS TEORES DE HISTAMINA E TIRAMINA COM AMINAS BIOGÊNICAS

A correlação dos teores de tiramina e histamina, aminas totais e aminas biogênicas (putrescina, cadaverina, tiramina, histamina, feniletilamina e triptamina), utilizando a correlação de Pearson a 5% de probabilidade, está apresentada na tabela I.2. Foi encontrada correlação positiva entre os teores de tiramina e histamina com os teores totais de aminas e os de aminas biogênicas, obtidos em 1999-2001 e em 2005-2006.

Tabela I.2: Correlação entre os teores de tiramina, histamina, aminas totais e aminas biogênicas

	Tiramina	Histamina	Tiramina + Histamina	Aminas totais	Aminas biogênicas
Período de dezembro de 1999 a maio de 2001					
Tiramina	1				
Histamina	0,9387	1			
Tiramina + Histamina	0,9849	0,9842	1		
Aminas totais	0,9702	0,9740	0,9873	1	
Aminas biogênicas	0,9753	0,9803	0,9931	0,9950	1
Período de março de 2005 a maio de 2006					
Tiramina	1				
Histamina	0,8711	1			
Tiramina + Histamina	0,9417	0,9856	1		
Aminas totais	0,9136	0,8929	0,9268	1	
Aminas biogênicas	0,9126	0,8905	0,9248	0,9999	1

Aminas biogênicas = tiramina + histamina + putrescina + cadaverina + feniletilamina + triptamina.
Graus de liberdade (1999 a 2001) = 88; graus de liberdade (2005 a 2006) = 37.

Estes resultados indicam que além da proposta de PIMENTEL et al. (2001) para utilização dos teores de histamina e tiramina como critério da qualidade de queijo ralado, é possível utilizar também os teores de aminas biogênicas, aminas totais ou a soma de histamina e tiramina. Isto pode ser relevante para a seleção de um método mais simples e rápido para triagem.

4 CONCLUSÕES

Foram detectadas, nas amostras de queijo ralado analisadas no período de 2005 a 2006, as dez aminas investigadas. Espermina, espermidina, agmatina, feniletilamina, triptamina e serotonina estavam presentes em baixos teores. Putrescina e cadaverina foram encontradas na maioria das amostras em altos teores, podendo potencializar o efeito tóxico da histamina. Histamina e tiramina foram detectadas em 100% das amostras, sendo que em 62% poderiam causar efeitos adversos à saúde humana.

Comparando-se os teores de aminas nos queijos analisados nos períodos de 2005 a 2006 e 1999 a 2001, observou-se redução dos teores máximos de histamina e tiramina. No entanto, isto não indica melhoria na qualidade dos queijos ralados, visto que 62% das amostras poderiam causar intoxicações. Além disso, não se tem relatos sobre os efeitos tóxicos do uso contínuo destas substâncias. Desta forma, este estudo reafirma a necessidade de que os teores de tiramina e histamina em queijos ralados sejam um critério de qualidade higiênico-sanitário.

A partir dos resultados da correlação, sugere-se, quando a análise de histamina e tiramina separadamente não for possível, o uso alternativo dos teores de aminas biogênicas, aminas totais ou da soma de histamina e tiramina para avaliar a aptidão do queijo utilizado como matéria-prima para queijo ralado.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA EM QUEIJO PARMESÃO RALADO

RESUMO

A cromatografia líquida de alta eficiência com par iônico e detecção fluorométrica após derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído é o método de escolha para separação e quantificação de aminas bioativas em alimentos. Entretanto, ainda não há consenso sobre a metodologia mais apropriada para a extração de aminas de diferentes alimentos. Para obter a melhor condição de extração de histamina e tiramina de queijo ralado, foram avaliadas a seletividade e a eficiência na recuperação de aminas bioativas de queijo parmesão ralado utilizando os ácidos clorídrico, tricloroacético, perclórico, sulfosalicílico e acético, tampão borato ($\text{pH } 10,4 \pm 0,2$), metanol e etanol. A eficiência da extração foi afetada pelos teores de aminas presentes na amostra, pelo tipo, concentração e temperatura do extrator e pelo procedimento utilizado. Os procedimentos com ácido clorídrico e etanol permitiram extração adequada de histamina e tiramina e não apresentaram diferença significativa entre os dois níveis de adição de padrão. Nenhum dos solventes foi seletivo para histamina e tiramina. O etanol por sua vez permitiu recuperação adequada das aminas biogênicas (histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, feniletilamina e triptamina) e praticamente eliminou a interferência das poliaminas. Para a extração adequada das aminas bioativas de queijo ralado, HCl 1,0 mol/L foi selecionado, por apresentar boas recuperações para a maioria das aminas.

Palavras-chave: Queijo parmesão ralado, aminas bioativas, extração.

1 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência de oito solventes extratores em recuperar histamina e tiramina e eliminar interferentes da matriz queijo parmesão ralado, utilizando um procedimento de CLAE com par iônico para a separação e quantificação de dez aminas bioativas. Os objetivos específicos foram (i) verificar a influência da concentração de ácido clorídrico na extração de histamina, tiramina e outras oito aminas de queijo parmesão ralado; (ii) verificar a influência da extração sucessiva de histamina, tiramina e outras oito aminas de queijo parmesão ralado com ácido sulfosalicílico; (iii) otimizar o método de extração com metanol; (iv) verificar a influência da temperatura do etanol na extração de histamina, tiramina e outras oito aminas de queijo parmesão ralado; (v) comparar a eficiência dos métodos de extração por meio da recuperação obtida pela análise da amostra com e sem adição de solução padrão; (vi) verificar a influência da concentração da solução padrão de amina adicionada na recuperação de histamina e tiramina e eliminação de interferentes da matriz queijo parmesão ralado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

As amostras de queijo parmesão ralado foram adquiridas, no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. A amostra indentificada no capítulo I com menor teor de histamina e tiramina foi selecionada para o estudo do efeito dos procedimentos de extração na recuperação de aminas. Para obtenção de um *pool* de 500 g, foram agrupados e homogeneizadas várias embalagens da mesma marca e lote de queijo parmesão ralado. Amostras sem adição de padrão foram utilizadas como matriz em alguns experimentos, enquanto amostras adicionadas de duas concentrações (5,0 e 10,0 mg/100 g) de solução padrão contendo dez aminas foram utilizadas em outros. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.1.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto os solventes utilizados na CLAE (acetonitrila e metanol), que foram de grau cromatográfico. A água ultrapura foi obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Os padrões das aminas bioativas histamina (HIM, dicloridrato), tiramina (TIM, cloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), espermidina (EPD, tricloridrato), agmatina (AGM, complexo sulfato creatinina), putrescina (PUT, dicloridrato), cadaverina (CAD, dicloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato), triptamina (TRM) e 5-hidroxitriptamina (serotonina – SRT, cloridrato) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). *orto*-Ftalaldeído também foi adquirido da Sigma.

2.1.3 Preparo da solução padrão de aminas

As aminas foram pesadas considerando-se o peso da base livre e foram dissolvidas em solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L, obtendo-se soluções individuais de 1,0 mg de cada amina/mL. Um mililitro de cada amina foi transferido para um balão volumétrico de 10,00 mL para preparo da solução contendo 0,1 mg/mL de cada amina. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição com HCl 0,1 mol/L de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 10,0 mL da solução com as dez aminas em balão volumétrico de 100,00 mL, obtendo-se as concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 10,0 µg/mL. Estas soluções foram utilizadas para o preparo da curva padrão externa que foi utilizada para quantificar as aminas.

As soluções de 100,0 µg/mL e 50,0 µg/mL com as dez aminas foram preparadas transferindo-se 1,0 mL e 0,5 mL, respectivamente, da solução 1,0 mg/mL de cada uma das aminas para um balão volumétrico de 10,00 mL e completando com HCl 0,1 mol/L. Estas soluções foram utilizadas nos estudos de recuperação de aminas com adição de padrão. As soluções foram armazenadas em frascos de polietileno a 4 ± 1 °C.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Otimização dos métodos de extração de aminas bioativas de queijo ralado

Diferentes métodos descritos na literatura utilizando o mesmo solvente de extração foram comparados com o objetivo de selecionar o que apresentava melhor recuperação

de aminos. Os critérios de seleção de concentrações dos solventes extratores, massa da matriz e volume dos solventes extratores foram embasados nos métodos já descritos na literatura. Os experimentos foram realizados em triplicata em condições de repetibilidade (mesma amostra, reagentes e dia de análise) e os extratos obtidos foram analisados quanto aos teores de aminos por CLAE de fase reversa com par iônico de acordo com o método descrito por VALE & GLÓRIA (1997).

2.2.1.1 Influência da concentração do ácido clorídrico na extração de aminos bioativas de queijo parmesão ralado

A eficiência de duas concentrações (0,1 mol/L e 1,0 mol/L) de ácido clorídrico (HCl) em extrair aminos de queijo ralado foi determinada (VALE & GLÓRIA, 1997; CINQUINA et al., 2004). Foram adicionados 15,00 mL de solução de HCl a cerca de 1,0000 g de amostra de queijo parmesão ralado e as amostras foram agitadas em mesa agitadora orbital a 250 rpm (Tecnal TE-140, Piracicaba, SP) por 10 min. A mistura foi centrifugada a 11.180 g a 4 °C por 21 min em centrífuga refrigerada (Jouan CR3i, Saint Herblain, França) e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo. A extração foi repetida por mais duas vezes com 15,00 mL do ácido pelo mesmo procedimento, os filtrados foram combinados e o volume foi completado para 50,0 mL. As extrações foram realizadas em triplicata, utilizando-se a matriz (queijo ralado) sem e com adição de 5,0 e 10,0 mg/100 g de padrão de aminos.

2.2.1.2 Influência da extração sucessiva com ácido sulfosalicílico na recuperação de aminos bioativas de queijo parmesão ralado

Foram adicionados 10,0 mL de ácido sulfosalicílico 12,0 g/100 mL a cerca de 2,0000 g de amostra de queijo parmesão ralado e a mistura foi mantida a 4 °C por 30 min. Após agitação em mesa agitadora orbital por 10 min, as amostras foram centrifugadas a 11.180 g a 4 °C por 21 min e filtradas em papel de filtro qualitativo (BUTS et al., 1995).

O procedimento com uma etapa de extração foi comparado ao realizado com três extrações consecutivas de aminos da mesma amostra de queijo. Foram adicionados 7,0 mL de ácido sulfosalicílico 12,0 g/100 mL a cerca de 2,0000 g de amostra de queijo parmesão ralado. As amostras foram agitadas, centrifugadas e filtradas em papel de filtro qualitativo como descrito acima. A extração foi repetida por mais duas vezes e os extratos foram combinados.

2.2.1.3 Padronização da extração metanólica de aminas bioativas em queijo parmesão ralado

Foi investigada a eficiência da extração com metanol conforme o procedimento descrito pela AOAC (1995) para determinação de histamina em pescado. Quatro gramas de queijo parmesão ralado foram homogeneizados em mesa agitadora orbital com 20,0 mL de metanol. A amostra foi aquecida a 60 °C por 15 min em banho-maria, resfriada e transferida para um balão volumétrico de 50,00 mL. O volume do balão foi completado com metanol. O extrato foi centrifugado a 11.180 g a 4 °C por 21 min e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo.

O mesmo procedimento foi avaliado com três extrações consecutivas de cerca de 2,0000 g da amostra de queijo parmesão ralado, 7,0 mL de metanol em cada extração. As amostras foram agitadas em mesa agitadora, aquecidas a 60 °C por 15 min e centrifugadas conforme descrito acima.

Observando as características de solubilidade dos sais de histamina e tiramina, foi testado um terceiro procedimento de extração ácida com metanol, adaptando as condições descritas por WALTERS (1984). Foram adicionados 1,0 mL de solução de HCl 0,1 mol/L e 7,0 mL de metanol a cerca de 2,0000 g de amostra de queijo parmesão ralado. As amostras foram agitadas, centrifugadas a 11.180 g a 4 °C por 21 min e filtradas em papel de filtro qualitativo. O resíduo sólido foi extraído mais duas vezes com 7,0 mL de metanol e 1,0 mL de ácido seguindo o mesmo procedimento.

2.2.1.4 Influência da temperatura do etanol na extração de aminas bioativas em queijo parmesão ralado

A influência de duas temperaturas do etanol, fervente e a temperatura ambiente (21 ± 1 °C), na extração de aminas bioativas foi investigada. Para a extração a temperatura ambiente adicionaram-se 7,0 mL de etanol a cerca de 2,0000 g da amostra de queijo parmesão ralado. As amostras foram agitadas por 10 min em mesa agitadora orbital e centrifugadas a 11.180 g a 4 °C por 21 min. Em seguida, as amostras foram filtradas em papel de filtro qualitativo. A extração foi repetida por mais duas vezes e os extratos foram combinados (SATO et al., 1970).

Na extração a quente, cerca de 4,0000 g da mesma amostra de queijo parmesão ralado foram homogeneizados com 20,0 mL de etanol em mesa agitadora orbital por 10 min. A mistura foi aquecida em banho-maria fervente por 15 min, resfriada e transferida para um balão volumétrico de 50,00 mL. O volume do balão foi completado com etanol e

o extrato foi centrifugado conforme descrito acima. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo (WHEATON & STEWART, 1970).

2.2.2 Comparação da eficiência de diferentes procedimentos de extração na recuperação de aminos bioativas

As quatro condições de extração otimizadas previamente e outros métodos utilizando solventes ácidos e alcalino foram comparados quanto à eficiência de extração de aminos bioativas da matriz de queijo pelo método de adição de padrão em duas concentrações. Os experimentos com cada extrator foram realizados em triplicata em condições de repetibilidade, utilizando-se a matriz (queijo ralado) sem e com adição de 5,0 e 10,0 mg/100 g de aminos. A adição da solução de aminos ocorreu antes da adição dos solventes extratores. Os extratos obtidos foram analisados quanto aos teores de aminos por CLAE de fase reversa com par iônico de acordo com o método descrito por VALE & GLÓRIA (1997). O delineamento estatístico utilizado nesta etapa foi o fatorial 2x8 (PIMENTEL-GOMES, 2000).

2.2.2.1 Extração em meio ácido e alcalino

Amostras de queijo parmesão ralado (1,0000 g) sem e com adição de duas concentrações das dez aminos foram homogeneizadas com 15,00 mL de ácido [HCl 1,0 mol/L; ácido tricloroacético 5,0 g/100 mL (VALE & GLÓRIA, 1997); ácido sulfosalicílico 12,0 g/100 mL; ácido perclórico 0,4 mol/L (NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000); ácido acético 15,0 g/100 mL (WHITE et al., 1968)] ou tampão borato (SEN, 1969; JALON et al., 1983), pH $10,2 \pm 0,2$ (50,0 mL de solução de ácido bórico 0,1 mol/L e KCl 0,1 mol/L e 46,5 mL de solução de NaOH 0,1 mol/L) em mesa agitadora orbital a 250 rpm por 10 min. A mistura foi centrifugada a 11.180 g a 4 °C por 21 min e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo. A extração foi repetida por mais duas vezes com 15,00 mL do ácido ou tampão borato pelo mesmo procedimento. Os filtrados foram combinados e o volume foi completado para 50,00 mL (VALE & GLÓRIA, 1997).

2.2.2.2 Extração com solvente orgânico

Amostras de queijo parmesão ralado (1,0000 g) sem e com adição de duas concentrações das dez aminos foram homogeneizadas com 20,00 mL do solvente orgânico (metanol ou etanol) em mesa agitadora orbital a 250 rpm por 10 min. A amostra com metanol foi aquecida a 60 °C por 15 min (AOAC, 1995) e a amostra com etanol foi

aquecida em banho-maria fervente por 15 min (WHEATON & STEWART, 1970). A mistura foi resfriada, transferida para balão volumétrico de 50,00 mL e o volume foi completado com o respectivo solvente. O extrato foi centrifugado a 11.180 g a 4 °C por 21 min e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo.

2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE

2.3.1 Separação e determinação de aminas bioativas por CLAE com par iônico

Todos os extratos obtidos nos diferentes estudos foram filtrados em membranas (13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro) tipo HAWP para solvente aquoso e HVWP para solvente orgânico (Millipore Corp. Milford, MA, EUA). As aminas foram separadas por CLAE de fase reversa com par iônico e quantificadas fluorometricamente a 340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente, após derivação pós-coluna com o-ftalaldeído, conforme descrito no capítulo I.

2.3.2 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA E OITO AMINAS INTERFERENTES DE QUEIJO PARMESÃO RALADO

3.1.1 Influência da concentração de ácido clorídrico

A eficiência de duas concentrações de ácido clorídrico (0,1 e 1,0 mol/L) em extrair histamina, tiramina e oito aminas interferentes de queijo parmesão ralado adicionado de dez aminas está indicado na tabela II.1 como a recuperação média de dois níveis de adição. Não houve influência significativa da concentração de HCl na extração de

histamina, tiramina e também para a maioria das aminas. Entretanto, houve diferença significativa para a amina aromática feniletilamina e também para as indolaminas triptamina e serotonina, que apresentaram maior recuperação quando extraídas com HCl 0,1 mol/L.

Tabela II.1: Recuperação média de aminas bioativas extraídas de queijo parmesão ralado adicionado de padrão em dois níveis de concentração (5,0 e 10,0 mg/100 g) com duas concentrações de HCl

Concentração de HCl	% recuperação média de aminas bioativas (% CV)										
	HIM	TIM	EPM	EPD	AGM	PUT	CAD	FEM	TRM	SRT	Média
0,1 mol/L	109 (27)	104 (40)	100 (11)	94 (12)	96 (15)	95 (21)	101 (47)	99 a (9)	92 a (11)	79 a (12)	97 a (25)
1,0 mol/L	102 (9)	110 (8)	92 (14)	89 (8)	87 (9)	92 (12)	87 (31)	85 b (10)	76 b (12)	62 b (17)	88 b (19)

HIM: histamina; TIM: tiramina; EPM: espermina; EPD: espermidina; AGM: agmatina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEM: feniletilamina; TRM: triptamina; SRT: serotonina; CV: coeficiente de variação. Valores médios em uma mesma coluna com diferentes letras são significativamente diferentes (Análise de variância, $p \leq 0,05$).

De uma forma geral, as porcentagens de recuperação da histamina, tiramina e da maioria das aminas estavam dentro dos limites recomendados pelo *CODEX ALIMENTARIUS* (1993) para analitos na faixa de concentração de mg/100 g, exceto pela serotonina nas duas concentrações do ácido e pela triptamina com HCl 1,0 mol/L. Entretanto, quando observa-se o coeficiente de variação (CV), apenas cadaverina e serotonina excederam o percentual de CV máximo recomendado (15%) no extrato com HCl 1,0 mol/L, enquanto com HCl 0,1 mol/L, coeficientes de variação maiores que 15% foram observados para tiramina, histamina, putrescina e cadaverina. Baseado nestes resultados, é mais apropriado utilizar HCl 1,0 mol/L para extrações de histamina e tiramina de queijo ralado, pela melhor reprodutibilidade.

Concentrações mais elevadas de HCl (1,0 mol/L) comparadas a 0,05 e 0,1 mol/L também foram consideradas mais adequadas por CINQUINA et al. (2004) para a extração de putrescina, cadaverina, espermidina e histamina de pescado por cromatografia de troca iônica com porcentagens de recuperação variando entre 91 e 98%. Uma provável explicação para este comportamento é a capacidade da solução ácida mais concentrada de quebrar a ligação de algumas aminas a outros componentes da matriz.

3.1.2 Influência da extração sucessiva com ácido sulfosalicílico

O uso de ácido sulfosalicílico já foi relatado para extração de amins bioativas em leite humano e fórmulas infantis artificiais (POLLACK et al., 1992; BUTS et al., 1995), em sucos de frutas cítricas (WHEATON & STEWART, 1965) e para extração de aminoácidos em queijo (CLIFFE & LAW, 1991). O uso deste ácido foi descrito para extração de amins bioativas em queijo pela primeira vez e por isto foi necessária a padronização do procedimento.

Os teores de histamina, tiramina e oito amins bioativas interferentes extraídas de queijo parmesão ralado com ácido sulfosalicílico estão indicados na tabela II.2. As indolaminas triptamina e serotonina não foram detectadas nas amostras analisadas. Isto está de acordo com trabalhos anteriores em que estas amins estão presentes em baixos teores ou não são detectadas em queijo (VALE & GLÓRIA, 1997; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000; PIMENTEL et al., 2001).

Tabela II.2: Influência do número de extrações sucessivas com ácido sulfosalicílico 12,0 g/100 mL nos teores de amins bioativas de queijo parmesão ralado

Número de extrações	Teor de amins bioativas em mg/100 g (% CV)										
	HIM	TIM	EPM	EPD	AGM	PUT	CAD	FEM	TRM	SRT	Total
1	6,90 b (5)	5,91 b (5)	0,06 b (4)	nd b	0,18 b (9)	0,38 b (4)	0,73 b (5)	0,40 b (5)	nd	nd	14,56 b
3	12,19 a (11)	9,55 a (8)	0,11 a (13)	0,03 a (33)	0,29 a (6)	0,62 a (3)	1,18 a (4)	0,70 a (6)	nd	nd	24,67 a

HIM: histamina; TIM: tiramina; EPM: espermina; EPD: espermidina; AGM: agmatina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEM: feniletilamina; TRM: triptamina; SRT: serotonina; CV: coeficiente de variação; nd: não detectado (limite de detecção: EPD = 0,02 mg/100 g; TRM = 0,20 mg/100 g; SRT = 0,10 mg/100 g). Valores médios em uma mesma coluna com diferentes letras são significativamente diferentes (Análise de variância, $p \leq 0,05$).

Houve diferença significativa entre os teores obtidos com uma e com três extrações sucessivas para histamina, tiramina e também para a maioria das amins interferentes. O procedimento com três extrações apresentou concentrações 1,6 a 1,8 vezes maiores do que o procedimento com apenas uma etapa de extração. Baseado nestes resultados torna-se indispensável executar as etapas de adição do ácido, agitação e centrifugação três vezes para se obter uma melhor recuperação das amins. Isto está de acordo com a

teoria de extração em que extrações sucessivas são necessárias para evitar a saturação da solução extratora (VOGEL, 1989).

Os dois métodos apresentaram coeficientes de variação adequados para histamina, tiramina e para as aminas interferentes, exceto para espermidina. Esta amina não foi recuperada pela extração em uma única etapa, mas foi detectada em baixa concentração – próxima ao limite de quantificação do método – na extração realizada três vezes. Este pode ser o motivo para o alto valor de CV observado para esta poliamina.

3.1.3 Influência do método de extração metanólica

O procedimento descrito pela AOAC (1995) para extração de histamina em pescado, ou seja, metanol a 60 °C, apresentou os melhores resultados para histamina, tiramina e para a maioria (seis) das aminas interferentes (tabela II.3). As indolaminas triptamina e serotonina não foram detectadas nas amostras analisadas como observado previamente. Não houve diferença significativa nos teores de espermina e agmatina extraídas nas diferentes condições. Os três procedimentos apresentaram coeficientes de variação apropriados, exceto para espermina. É possível que isto seja devido aos baixos teores de espermina encontrados nas amostras de queijo, que estão próximos ao limite de detecção do método.

Tabela II.3: Teores de aminas bioativas obtidas pela extração de queijo parmesão ralado com metanol utilizando diferentes procedimentos

Extração	Teor de aminas bioativas em mg/100 g (% CV)									
	HIM	TIM	EPM	EPD	AGM	PUT	CAD	FEM	TRM	SRT
AOAC (1995)	14,81 a (3)	10,34 a (3)	0,03 a (87)	0,25 a (12)	0,20 a (4)	0,61 a (4)	1,27 a (3)	0,86 a (2)	nd	nd
Extrações sucessivas	12,11 b (6)	8,40 b (7)	0,05 a (1)	0,17 b (6)	0,21 a (10)	0,50 b (7)	1,02 b (7)	0,72 b (1)	nd	nd
Meio ácido	9,35 c (12)	7,12 c (5)	0,05 a (19)	nd c	0,22 a (17)	0,45 b (5)	0,88 c (5)	0,54 c (10)	nd	nd

HIM: histamina; TIM: tiramina; EPM: espermina; EPD: espermidina; AGM: agmatina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEA: feniletilamina; TRM: triptamina; SRT: serotonina; CV: coeficiente de variação; nd: não detectado (limite de detecção: EPD = 0,02 mg/100 g; TRM = 0,20 mg/100 g; SRT = 0,10 mg/100 g). Valores médios em uma mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$).

Os resultados obtidos sugerem que a extração sucessiva de três vezes com metanol a 60 °C não melhora a recuperação como esperado e observado anteriormente. Isto é controverso com a teoria de extração líquido-líquido (VOGEL, 1989; HARRIS, 2001). Entretanto, o uso sucessivo de altas temperaturas durante a extração das amostras pode ter permitido e acelerado a formação de compostos, que podem ter reagido com as aminas. Desta forma, é necessário analisar outros parâmetros além da saturação, como ligação das aminas a outros compostos e possíveis reações.

A incorporação de ácido no meio de extração diminuiu a recuperação de histamina, tiramina e também da espermidina, cadaverina, e feniletilamina das amostras de queijo. Desta forma, para extração de aminas de queijo com metanol a 60 °C, apenas uma etapa de extração deveria ser realizada para obter melhores resultados e não há a necessidade de acidificar o meio.

Os teores de histamina e tiramina estavam elevados no extrato, alcançando o limite superior da faixa linear da curva analítica. Para avaliar a eficiência da recuperação, principalmente após adição de padrão, foi necessário a diluição do extrato. Desta forma, para a etapa de comparação dos solventes extratores, foi pesada quantidade menor da amostra de queijo ralado e o volume final foi 50,00 mL.

3.1.4 Influência da temperatura do etanol

A extração da histamina, da tiramina e das demais aminas de queijo parmesão ralado foi influenciada significativamente pela temperatura do etanol durante a extração (tabela II.4). A extração a quente foi significativamente maior para histamina e tiramina e também para as diaminas (putrescina e cadaverina) e a amina fenólica feniletilamina, apresentando concentrações 1,4 a 2,2 vezes maiores que a temperatura ambiente. Estes resultados estão em acordo com a solubilidade destes compostos no etanol fervente (LIDE, 1995; WINDHOLZ, 1996).

As indolaminas triptamina e serotonina não foram detectadas, o que está em acordo com as amostras de queijo analisadas previamente. Agmatina não foi extraída da matriz pelo etanol ou não estava presente em teores detectáveis nas amostras de queijo utilizadas neste experimento. Apenas espermidina e espermina apresentaram resultados maiores na extração a temperatura ambiente com etanol. Baseado nestes resultados, a extração com etanol pode ser vantajosa se uma extração seletiva de aminas for desejável, com ênfase nas diaminas, aminas fenólicas e histamina a temperatura fervente.

Tabela II.4: Influência da temperatura do etanol na extração de aminos bioativas de queijo parmesão ralado

Extração etanólica	Teores de aminos bioativas em mg/100 g (% CV)									
	HIM	TIM	EPM	EPD	AGM	PUT	CAD	FEM	TRM	SRT
Temperatura ambiente	10,06 b (8)	5,65 b (7)	0,02 a (20)	0,05 a (5)	nd	0,29 b (7)	0,60 b (7)	0,60 b (7)	nd	nd
Fervente	18,51 a (4)	7,86 a (5)	nd b	nd b	nd	0,64 a (4)	0,98 a (5)	0,85 a (5)	nd	nd

HIM: histamina; TIM: tiramina; EPM: espermina; EPD: espermidina; AGM: agmatina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEA: feniletilamina; TRM: triptamina; SRT: serotonina; CV: coeficiente de variação; nd: não detectado (limite de detecção: EPM e EPD = 0,02 mg/100 g; AGM = 0,10 mg/100 g; TRM = 0,20 mg/100 g; SRT = 0,10 mg/100 g). Valores médios em uma mesma coluna com letra diferente são significativamente diferentes (Análise de variância, $p \leq 0,05$).

3.2 INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE HISTAMINA, TIRAMINA E OITO AMINAS INTERFERENTES DE QUEIJO RALADO

As porcentagens de recuperação da histamina, tiramina e de oito aminos interferentes de queijo parmesão ralado pelos diferentes procedimentos de extração variaram (tabela II.5) com porcentagens de 4% para agmatina (extração com os solventes orgânicos metanol e etanol) até 192% para putrescina, utilizando TCA 5%. Estes resultados indicam que alguns solventes extratores utilizados não foram eficientes na recuperação de aminos da matriz de queijo. Por outro lado, alguns solventes provavelmente extraíram compostos interferentes ou permitiram a formação de aminos bioativas, fornecendo porcentagens de recuperação excessivas. A extração das aminos bioativas da matriz queijo foi afetada significativamente pela concentração das aminos presentes e também pelo solvente utilizado.

3.2.1 Influência da concentração da amina na matriz na recuperação durante a extração

A quantidade de aminos na matriz, determinada pela concentração de solução padrão adicionada à amostra, afetou significativamente a recuperação de histamina, tiramina e das demais aminos investigadas durante a extração com ácido tricloroacético. Resultados semelhantes foram encontrados por ZEE et al. (1985) na extração de dez aminos, principalmente no queijo maturado e também por JOOSTEN & OLIEMAN (1986)

Tabela II.5: Influência do tipo de solvente extrator na recuperação de aminas bioativas de amostras de queijo parmesão ralado adicionadas de duas concentrações (5,0 e 10,0 mg/100 g) de aminas

	% de Recuperação (% CV)							
	HCl 1,0 mol/L	TCA 5%	ASS 12%	CH ₃ COOH 15%	HClO ₄ 0,4 mol/L	Metanol	Etanol	Tampão borato
Histamina								
+ 5 mg/100 g	97,6 bc (2)	82,4 cd,y (23)	101,5 bc (9)	76,6 cd (9)	59,1 d,y (27)	131,9 a (7)	99,7 bc (9)	112,3 ab (31)
+ 10 mg/100 g	105,9 b (12)	177,6 a,x (14)	116,3 b (7)	61,9 c (10)	111,6 b,x (20)	115,6 b (15)	93,4 b (4)	106,3 b (4)
Tiramina								
+ 5 mg/100 g	114,1 ab (2)	99,4 abc,y (11)	97,8 abc (9)	65,3 d (9)	82,8 cd (17)	118,6 ab (2)	94,1 bc (13)	122,8 a,x (15)
+ 10 mg/100 g	106,8 bc (11)	230,1 a,x (18)	121,8 b (4)	56,4 e (11)	92,2 cd (19)	120,2 b (16)	96,4 bcd (5)	78,8 e,y (18)
Espermina								
+ 5 mg/100 g	81,5 a (5)	45,0 b,y (16)	46,4 b,y (41)	62,6 b (7)	97,7 a,y (11)	23,1 c,y (14)	16,0 c (26)	19,2 c (22)
+ 10 mg/100 g	102,7 c (7)	146,4 a,x (13)	137,3 ab,x (10)	56,8 d (7)	123,0 b,x (18)	57,3 d,x (5)	32,7 e (4)	40,7 de (23)
Espermidina								
+ 5 mg/100 g	84,2 bc (2)	114,3 a,y (23)	92,3 b,y (13)	55,1 d (8)	90,6 b (5)	63,0 cd (5)	5,8 e (6)	71,5 bcd (12)
+ 10 mg/100 g	93,7 bc (8)	174,0 a,x (12)	158,3 a,x (8)	49,4 d (6)	111,7 b (19)	86,7 c (9)	27,6 e (6)	82,3 c (22)
Agmatina								
+ 5 mg/100 g	80,3 bc (4)	115,2 a,y (7)	55,5 b,y (12)	65,7 cd (3)	86,9 b,y (4)	3,9 e (7)	3,9 e (7)	105,4 a (8)
+ 10 mg/100 g	92,8 b (5)	157,0 a,x (6)	163,1 a,x (5)	60,2 c (4)	106,2 b,x (19)	13,3 d (6)	5,5 d (10)	106,4 b (20)
Putrescina								
+ 5 mg/100 g	87,2 cd (14)	113,5 a,y (7)	88,4 bcd,y (15)	80,4 cd (5)	75,5 d,y (17)	111,3 ab (4)	97,6 abc (7)	116,6 a (3)
+ 10 mg/100 g	97,2 c (7)	192,8 a,x (14)	149,3 b,x (6)	61,4 d (12)	110,4 c,x (18)	114,9 c (6)	94,1 c (3)	100,0 c (3)
Cadaverina								
+ 5 mg/100 g	62,2 cd,y (4)	110,6 b,y (16)	98,1 b,y (8)	85,1 bc (2)	40,3 d,y (18)	145,9 a (5)	152,4 a (7)	109,3 b (2)
+ 10 mg/100 g	111,5 cd,x (4)	253,5 a,x (17)	149,6 b,x (10)	55,7 e (10)	140,9 b,x (19)	126,7 bc (12)	125,0 bc (5)	87,5 d (8)
Feniletilamina								
+ 5 mg/100 g	79,6 cd (6)	106,2 ab,y (4)	89,2 c,y (12)	78,7 cd (4)	82,5 cd,y (6)	110,3 a (3)	91,5 bc (3)	69,3 d (12)
+ 10 mg/100 g	90,9 cd (8)	145,8 a,x (9)	142,0 a,x (9)	71,1 e (5)	102,1 bc,x (19)	112,4 b (9)	83,1 de (3)	78,9 de (18)
Triptamina								
+ 5 mg/100 g	69,2 c (2)	98,5 ab,y (13)	72,4 c,y (12)	81,9 bc (5)	72,7 c,y (7)	106,4 a (3)	82,9 bc (9)	75,2 c (20)
+ 10 mg/100 g	83,3 cd (8)	134,8 a,x (10)	124,7 a,x (5)	70,5 d (5)	96,6 bc,x (20)	106,5 b (4)	87,6 cd (2)	86,9 cd (20)
Serotonina								
+ 5 mg/100 g	57,0 c (2)	80,5 b,y (11)	63,5 bc,y (12)	64,8 bc (6)	59,2 c,y (26)	116,1 a (8)	99,5 a (5)	50,3 c (11)
+ 10 mg/100 g	67,8 bc (20)	117,4 a,x (9)	126,6 a,x (12)	65,1 bc (4)	82,5 b,x (29)	128,0 a (9)	111,5 a (2)	51,4 c (18)

CV: coeficiente de variação; TCA: ácido tricloroacético; ASS: ácido sulfosalicílico; CH₃COOH: ácido acético; HClO₄: ácido perclórico. Valores com letras diferentes na mesma linha (a-e) ou coluna para cada amina (x-y) são significativamente diferentes (Teste de Duncan, p ≤ 0,05).

durante a extração de tiramina, triptamina e feniletilamina de queijo. A concentração de aminas na amostra também afetou a recuperação da maioria das aminas (80%) na extração com ácido sulfosalicílico e ácido perclórico. Estes resultados indicam que a extração de aminas da matriz é afetada pela concentração do analito presente quando se utiliza estes três ácidos – tricloroacético, sulfosalicílico e perclórico. A extração de apenas poucas aminas foi afetada pela concentração quando se utilizou os outros solventes, por exemplo, cadaverina com HCl, espermina com metanol e tiramina com tampão borato.

Levando em consideração a concentração de cada amina geralmente encontrada em queijo, os melhores solventes para a extração destes compostos seriam ácido acético e etanol, que não tiveram a eficácia alterada nas concentrações de aminas avaliadas. Tampão borato, HCl e metanol também poderiam ser utilizados, entretanto a extração de tiramina, cadaverina e espermina, respectivamente, seria significativamente afetada pela concentração da amina.

3.2.2 Influência do tipo de solvente na extração de aminas

Como indicado na figura II.1, os solventes apresentaram diferentes recuperações médias de histamina, tiramina e aminas bioativas da matriz queijo.

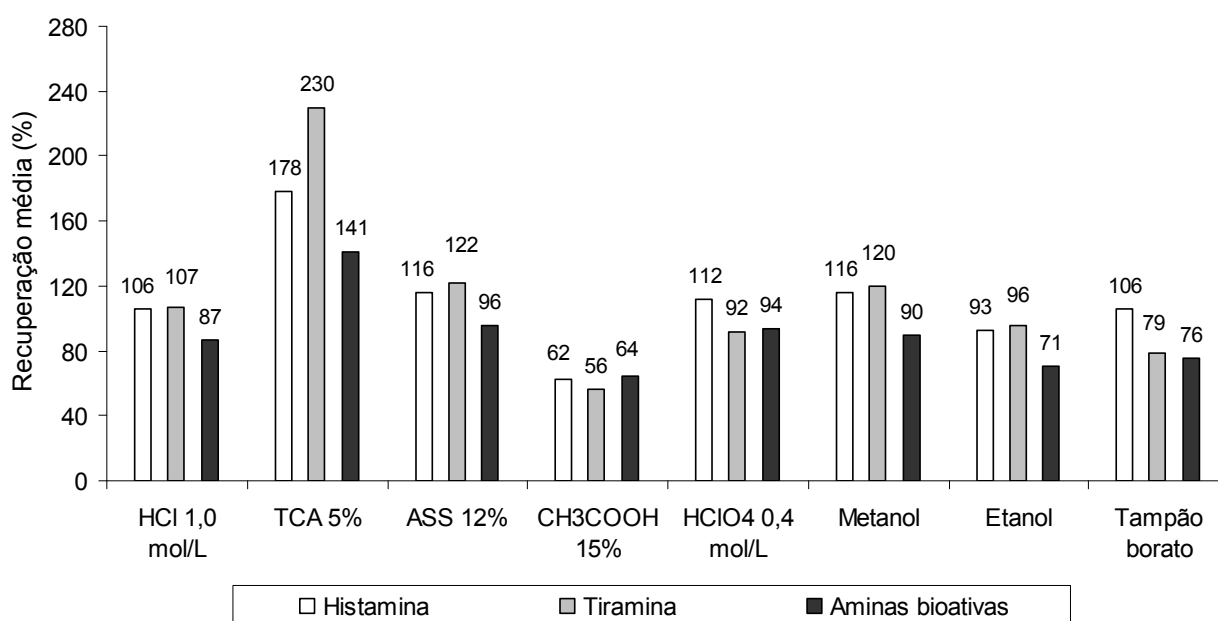


Figura II.1: Recuperação média da histamina, tiramina e aminas bioativas de queijo parmesão ralado durante extração com diferentes solventes. TCA: ácido tricloroacético; ASS: ácido sulfosalicílico; CH₃COOH: ácido acético; HClO₄: ácido perclórico.

O ácido tricloroacético apresentou a maior, mas excessiva porcentagem de recuperação para histamina, tiramina e demais amins de queijo ralado, sugerindo que ele pode causar reações químicas não controladas ou pode extrair mais compostos interferentes durante o procedimento de extração. Por outro lado, o ácido acético apresentou as menores porcentagens médias de recuperação. Nenhum dos solventes extraiu eficientemente todas as amins investigadas (tabela II.5). Além disso, cada solvente apresentou diferentes recuperações para os vários grupos de amins, provavelmente devido aos diferentes coeficientes de partição e solubilidade das amins no meio de extração (MORET & CONTE, 1996; VALE & GLÓRIA, 1997).

Com o objetivo de facilitar a decisão sobre qual é a melhor condição de extração das amins de queijo pelos diferentes solventes, as amins que atenderam os critérios estabelecidos pelo *CODEX ALIMENTARIUS* (1993), i.e. porcentagem de recuperação de 80 a 115% e coeficiente de variação menor que 15%, foram indicadas na tabela II.6. Quando levados em consideração os dois níveis de adição de padrão, histamina foi melhor extraída com HCl e etanol. Metanol que foi considerado pela AOAC (1995) um solvente ideal para extração de histamina de pescado, não apresentou bons resultados para queijo, com recuperações acima de 110%, sugerindo a extração de compostos interferentes ou formação de histamina durante a extração. Tiramina foi melhor extraída com etanol. O ácido perclórico também apresentou recuperações apropriadas, entretanto a repetibilidade não foi aceitável, devido aos valores do coeficiente de variação serem maiores que 15%.

Tabela II.6: Aminas bioativas que atenderam as recomendações do *Codex*¹ com consideração na porcentagem de recuperação e no coeficiente de variação durante a extração com diferentes solventes extratores

Quantidade de padrão adicionado	Aminas bioativas que atenderam o <i>Codex</i> /Solventes extratores							
	HCl 1,0 mol/L	TCA 5%	HClO ₄ 0,4 mol/L	ASS 12%	CH ₃ COOH 15%	Metanol a 60 °C	Etanol fervente	Tampão borato
5 mg/ 100 g	HIM, EPM, EPD, AGM, PUT, FEM	TIM, FEM, TRM, SRT	TIM, EPM, EPD, AGM, FEA	HIM, TIM, EPD, PUT, CAD, FEM	PUT, CAD, TRM	FEM, TRM	HIM, TIM, PUT, FEM, TRM, SRT	AGM, CAD
10 mg/ 100 g	HIM, TIM, EPM, EPD, AGM, PUT, FEM, TRM					EPD, TRM	HIM, TIM, PUT, FEM, TRM	HIM, PUT, CAD

¹*CODEX ALIMENTARIUS* (1993). TCA: ácido tricloroacético; HClO₄: ácido perclórico; ASS: ácido sulfosalicílico; CH₃COOH: ácido acético; HIM: histamina; TIM: tiramina; EPM: espermina; EPD: espermidina; AGM: agmatina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEM: feniletilamina; TRM: triptamina; SRT: serotonina. Aminas em negrito representam os teores que estas amins geralmente se encontram no queijo ralado.

Observando os teores de amins geralmente encontrados em queijo (VALE & GLÓRIA, 1997; PATTONO et al., 2000; PIMENTEL et al., 2001) – amins em negrito na tabela II.6 – o maior nível de adição de padrão deveria ser considerado para putrescina, cadaverina, histamina e tiramina, que são as amins encontradas em altas concentrações, enquanto o menor nível de adição de padrão deveria ser considerado para as poliaminas, agmatina e também para feniletilamina e as indolaminas. Então HCl, etanol fervente e tampão borato seriam os solventes extratores selecionados para histamina e os dois primeiros para tiramina.

As poliaminas espermina e espermidina apresentaram melhor recuperação com HCl, entretanto espermidina também foi extraída adequadamente com ácido perclórico. Agmatina foi melhor extraída de queijo pelo tampão borato, entretanto HCl e ácido perclórico também apresentaram resultados apropriados. Esta informação também é relevante, pois poucos trabalhos investigam a presença e a recuperação de agmatina de queijo. As diaminas putrescina e cadaverina foram melhor extraídas com tampão borato, entretanto putrescina foi semelhantemente bem extraída com HCl e com os solventes orgânicos metanol e etanol. A feniletilamina apresentou características similares às da tiramina descrita anteriormente. As indolaminas triptamina e serotonina apresentaram comportamentos diferentes. Quando os dois níveis de adição de padrão foi considerado, triptamina foi melhor extraída com os solventes orgânicos, entretanto, nenhum deles apresentou boa recuperação para serotonina.

De uma forma geral, HCl seria o melhor extrator de amins para queijo ralado, extraindo sete das dez amins. Os teores de amins que são exceções deveriam ser corrigidos pela porcentagem de recuperação que seria: 112% para cadaverina, 69% para triptamina e 57% para serotonina. Recuperações semelhantes foram observadas para as mesmas dez amins por VALE & GLÓRIA (1997) e por MORET & CONTE (1996) para oito amins (exceto agmatina e serotonina). Estes pesquisadores concordam que HCl mostra-se uma boa escolha para a análise de queijo.

4 CONCLUSÕES

A eficiência de extração variou significativamente para as amins bioativas analisadas e foi influenciada pelos teores de amins adicionadas no queijo, pelo tipo, pela concentração e temperatura do solvente utilizado.

Histamina apresentou recuperação adequada na extração com HCl 1,0 mol/L, etanol fervente e tampão borato e tiramina, na extração com HCl 1,0 mol/L e etanol fervente.

A extração com HCl 1,0 mol/L permitiu recuperação adequada da maioria das aminas de queijo ralado. Além disto, este foi um procedimento relativamente simples, barato e rápido, devendo, portanto ser utilizado para extração de aminas de amostras de queijo.

Na extração com etanol fervente, as aminas biogênicas (histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, feniletilamina e triptamina) apresentaram recuperações adequadas, enquanto as poliaminas não foram extraídas. Este solvente poderia ser utilizado na extração seletiva de aminas biogênicas.

Quando a extração seletiva de algumas aminas da matriz queijo ralado é desejada, diferentes solventes deveriam ser utilizados para otimizar a recuperação da amina de interesse. As poliaminas espermina e espermidina foram melhor extraídas com HCl; agmatina com tampão borato ou HCl; as diaminas alifáticas putrescina e cadaverina foram extraídas mais eficientemente com tampão borato e HCl, enquanto que feniletilamina e as indolaminas triptamina e serotonina apresentaram melhor recuperação com solventes orgânicos.

Estes resultados foram obtidos para queijo parmesão ralado que contem baixo teor de umidade (máx. 20%). Estudos devem também ser realizados para confirmar a eficiência do procedimento de extração na análise de outros tipos de queijo.

CAPÍTULO III

OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE DERIVAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA COM NINIDRINA E CLORETO DE DANSILA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO NA ANÁLISE DESSAS AMINAS SEM INTERFERÊNCIA

RESUMO

Algumas aminas bioativas podem ser detectadas e quantificadas diretamente por espectrofotometria no ultravioleta. No entanto, na maioria das vezes, são detectadas por espectrofotometria ou espectrofluorometria após derivação com uma série de reagentes, como cloreto de dansila (DnsCl), ninidrina, fluorescamina e *o*-ftalaldeído. Apesar da variedade de estudos, nem sempre a derivação é descrita com detalhes e não há consenso sobre qual a melhor condição de reação de cada derivante. O objetivo deste trabalho foi otimizar as reações de derivação com ninidrina e DnsCl e avaliar o potencial de detecção e determinação de histamina e tiramina sem interferentes por espectrofotometria de absorção molecular. As condições ideais da reação com ninidrina foram de pH 6,0 para histamina e pH 7,0 para tiramina, em meio tamponado com $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$; ninidrina 0,5 mg/mL dissolvida em metilglicol; 20 min de aquecimento a 100 °C. Os derivados da tiramina e da histamina apresentaram dois máximos de absorção em 568 e 402 nm e as oito aminas analisadas apresentaram perfis de absorção semelhantes. Os derivados da tiramina e da histamina com ninidrina permaneceram estáveis por 100 min. As condições ideais da reação com DnsCl foram 40 min de aquecimento a 60 °C. Os derivados da histamina e tiramina apresentaram absorção máxima em 372 nm e as oito aminas analisadas apresentaram perfis de absorção semelhantes. Os derivados da tiramina e da histamina com DnsCl permaneceram estáveis por mais de uma hora ao abrigo da luz e apresentaram absorvância menor na presença de luz.

Palavras-chave: Ninidrina, cloreto de dansila, tiramina, histamina, aminas bioativas, espectrofotometria de absorção molecular.

1 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de utilização de ninidrina e cloreto de dansila (DnsCl) na análise espectrofotométrica de absorção molecular de histamina e tiramina sem interferência de outras aminas. Os objetivos específicos foram (i) otimizar as reações de derivação da histamina e da tiramina com ninidrina; (ii) avaliar a estabilidade dos derivados de histamina e tiramina com ninidrina; (iii) avaliar a interferência de oito aminas bioativas no espectro de absorção molecular dos derivados de histamina e tiramina com ninidrina; (iv) otimizar as reações de derivação da histamina e da tiramina com DnsCl; (v) avaliar a estabilidade dos derivados de histamina e tiramina com DnsCl na ausência e na presença da luz; (vi) avaliar a interferência de oito aminas bioativas no espectro de absorção dos derivados de histamina e tiramina com DnsCl.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico. Os padrões das aminas bioativas histamina (HIM, dicloridrato), tiramina (TIM, cloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), espermidina (EPD, tricloridrato), agmatina (AGM, complexo sulfato creatinina), putrescina (PUT, dicloridrato), cadaverina (CAD, dicloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato), triptamina (TRM) e 5-hidroxitriptamina (serotonina – SRT, cloridrato) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Cloreto de dansila (DnsCl) foi adquirido da Sigma e ninidrina foi adquirida da Reagen.

2.1.2 Preparo da solução padrão de aminas

As aminas foram pesadas considerando-se o peso da base livre e foram dissolvidas em ácido clorídrico 0,1 mol/L, obtendo-se soluções individuais de 1,0 mg de

cada amina/mL. As soluções de trabalho foram feitas pela diluição da solução na concentração de 1,0 mg/mL. As soluções foram armazenadas em frascos de polietileno, à 4 ± 1 °C.

2.1.3 Soluções tampão

As soluções tampão fosfato pH 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 foram feitas de acordo com a tabela III.1. O tampão em pH 7,0 com Na_2HPO_4 e ácido cítrico também foi utilizado em uma etapa; e para isto foram misturados 16,5 mL de solução de Na_2HPO_4 0,2 mol/L com 3,5 mL de solução de ácido cítrico 0,1 mol/L. As soluções tampão de borato pH 9,0 e 10,0 foram feitas de acordo com a tabela III.2.

Tabela III.1: Preparo de soluções tampão fosfato em diferentes valores de pH

pH	Volume de KH_2PO_4 0,1 mol/L (mL)	Volume de NaOH 0,1 mol/L (mL)
5,0	50,0	2,5
6,0	50,0	5,7
7,0	50,0	29,6
8,0	50,0	46,8

Tabela III.2: Preparo de soluções tampão borato em diferentes valores de pH

pH*	Volume de H_3BO_3 0,1 mol/L (mL)	Volume de NaOH 0,1 mol/L (mL)
9,0	50,0	26,7
10,0	50,0	46,9

* Volume final de 100,00 mL.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Absorção de histamina e tiramina sem derivação na região do ultravioleta

Realizou-se, em espectrofotômetro Shimadzu 160A (Kyoto, Japão), varredura do espectro de absorção em 200 a 350 nm da histamina e tiramina na concentração de 20,0 $\mu\text{g/mL}$. A solução de tiramina 1,0 mg/mL foi dissolvida em soluções de HCl 0,1 mol/L para

preparar uma curva analítica nas concentrações de 20,0; 60,0; 100,0; 140,0 e 200,0 $\mu\text{g/mL}$ com leitura da absorvância em 275 nm. A curva analítica foi feita em triplicata, em três dias diferentes de análise.

2.2.2 Reação da histamina e tiramina com ninidrina

A reação das aminas com ninidrina foi realizada de acordo com o esquema demonstrado na figura III.1. Foram otimizados o meio da reação, o pH, a concentração de ninidrina e o tempo e a temperatura de aquecimento.

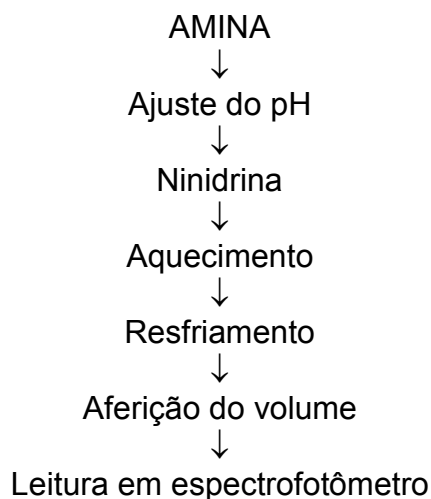


Figura III.1: Esquema do procedimento de derivação de aminas bioativas com ninidrina.

2.2.2.1 Avaliação do meio que ocorre a reação das aminas com ninidrina

Foi analisada a reação da ninidrina, em pH neutro, com as dez aminas estudadas, pipetando-se 1,00 mL da solução da amina 1,0 mg/mL. A solução foi neutralizada com NaOH 2,0 mol/L, foi adicionada de 1,0 mL de ninidrina 5,0 mg/mL e aquecida por 20 min em banho-maria fervente. A mistura foi resfriada em água corrente e transferida para balão volumétrico de 25,00 mL.

Algumas aminas formaram precipitado após o aquecimento. Foram testados dois tipos de solução tampão, Na_2HPO_4 com ácido cítrico e KH_2PO_4 com NaOH, ambas em pH 7,0 para observar sua interferência na formação do precipitado. Testou-se, ainda, a ninidrina dissolvida em metilglicol (etileno glicol monometil éter) ao invés de água e,

também, a necessidade da adição de solução tampão para estabilizar o pH do meio após a neutralização da amostra.

2.2.2.2 Determinação do pH ideal para a reação de histamina e tiramina com ninidrina

A reação da tiramina e da histamina com ninidrina foi testada em seis valores de pH diferentes (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0). Foi pipetado 0,5 mL da solução 1,0 mg/mL da amina e esta foi neutralizada com 0,1 mL de NaOH 0,5 mol/L. Foi adicionado 1,0 mL da solução tampão nos valores de pH a serem testados e 1,0 mL de ninidrina 5 mg/mL dissolvida em metilglicol. Em seguida, as soluções foram aquecidas por 20 min, em banho-maria fervente. Foi realizada a leitura das absorvâncias a 570 e 400 nm.

2.2.2.3 Determinação do tempo de aquecimento e da concentração do derivante ideais para a reação de histamina e tiramina com ninidrina

Foram analisadas duas concentrações de ninidrina, 5,0 e 10,0 mg/mL (LUKTON & OLCOTT, 1958; PANASIUK et al., 1998; STARCHER, 2001), e quatro tempos de aquecimento (5, 10, 20 e 30 min). Foi pipetado 1,00 mL da solução 1,0 mg/mL da amina e esta foi neutralizada com 0,2 mL de NaOH 0,5 mol/L. Foi adicionado 1,0 mL de tampão fosfato (KH_2PO_4 e NaOH em pH 7,0) e 1,0 mL de ninidrina dissolvida em metilglicol. As amostras foram aquecidas em banho-maria fervente. A mistura foi resfriada em água corrente, esta foi transferida para balão volumétrico de 25,00 mL e o volume foi completado com água destilada. Foi realizada uma varredura no espectro de absorção das aminas derivadas entre 350 e 700 nm e foram selecionados os comprimentos de onda de absorção máxima, nos quais as absorvâncias foram lidas. As análises foram realizadas com quatro repetições.

2.2.2.4 Determinação da temperatura de aquecimento ideal para a reação de histamina e tiramina com ninidrina

Foram analisadas três temperaturas de aquecimento (90, 95 e 100 °C). Foi pipetado 1,00 mL da solução 1,0 mg/mL da amina e esta foi neutralizada com 0,2 mL de NaOH 0,5 mol/L. Foi adicionado 1,0 mL de tampão fosfato em pH 7,0 e 1,0 mL de ninidrina 5,0 mg/mL dissolvida em metilglicol. As amostras foram aquecidas em banho-maria por 20 min. A mistura foi resfriada em água corrente, esta foi transferida para balão volumétrico de 25,00 mL e o volume foi completado com água destilada. Foi realizada uma varredura no espectro de absorção das aminas derivadas entre 350 e 700 nm. As

absorvâncias foram lidas nos comprimentos de onda que apresentaram máximos de absorção. As análises foram realizadas com quatro repetições.

2.2.2.5 Avaliação da interferência de oito aminas bioativas no espectro dos derivados da histamina e da tiramina com ninidrina

Após a otimização da reação, foi verificada a interferência de oito aminas no espectro dos derivados da tiramina e da histamina. Foi pipetado 0,5 mL da solução 1,0 mg/mL da amina e esta foi neutralizada com 0,1 mL de NaOH 0,5 mol/L. Foi adicionado 1,0 mL de tampão fosfato em pH 7,0 e 1,0 mL de ninidrina 5 mg/mL dissolvida em metilglicol. As amostras foram aquecidas por 20 min em banho-maria fervente. A mistura foi resfriada em água corrente, esta foi transferida para balão volumétrico de 25,00 mL e o volume foi completado com água destilada. Foi realizada varredura no espectro de absorção das aminas derivadas entre 350 e 700 nm.

2.2.2.6 Avaliação da estabilidade dos derivados de histamina e tiramina com ninidrina

Foi testada a estabilidade dos produtos da reação da ninidrina com tiramina e histamina, realizada de acordo com o item anterior, fazendo leituras da absorvância das aminas derivadas a 568 e 402 nm em intervalos de tempo de 45 min por aproximadamente 2 h. As aminas foram testadas em quatro concentrações diferentes (5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg/mL) com seis repetições.

2.2.2.7 Curva analítica dos derivados da histamina e tiramina com ninidrina

Foi preparada uma curva analítica para histamina e tiramina. Adicionou-se, em tubos de polietileno, 125,0; 187,0; 250,0; 375,0; 437,0 e 500,0 µL de solução padrão 1,0 mg/mL de histamina e 75,0; 150,0; 250,0; 300,0; 375,0 e 500,0 µL de solução padrão 1,0 mg/mL de tiramina. A reação foi realizada como descrito no item anterior. Realizou-se a leitura da absorvância de seis repetições de cada concentração das aminas a 568 e 402 nm.

2.2.3 Reação de histamina e tiramina com cloreto de dansila

A reação das aminas com cloreto de dansila foi realizada de acordo com o esquema demonstrado na figura III.2. Foram otimizados o meio da reação, a adição de NH₄OH, o tempo e a temperatura de aquecimento.

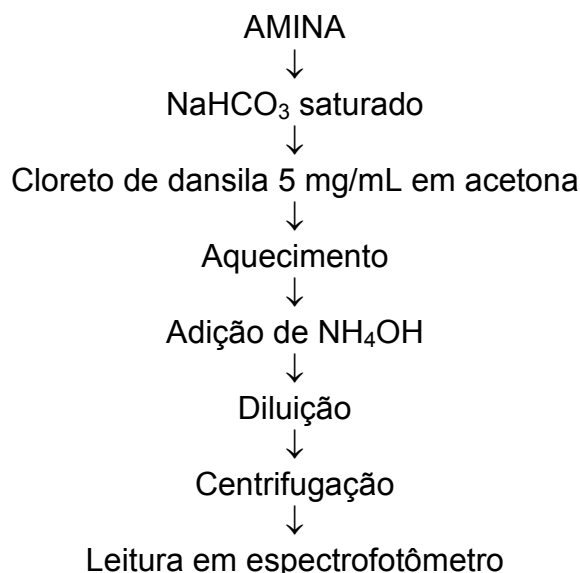


Figura III.2: Esquema do procedimento de derivação de aminas bioativas com cloreto de dansila.

2.2.3.1 Influência do solvente na derivação de histamina e tiramina com DnsCl

Para a reação da tiramina e histamina com DnsCl, foi utilizado inicialmente o procedimento adaptado de MORET et al. (1996). A 500,0 μ L da solução padrão 0,5 mg/mL da amina, foram adicionados 0,5 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio e 1,0 mL de DnsCl 5 mg/mL em acetona. A mistura foi homogeneizada em agitador Vortex e mantida por 1 h a 40 °C. Em seguida, foram adicionados 8,0 mL de água destilada ou etanol. A mistura foi centrifugada por 5 min a 3.354 g e foi feita a varredura do espectro de absorção. Todo o procedimento foi realizado ao abrigo da luz com cinco repetições.

2.2.3.2 Influência da adição de NH₄OH após a reação de histamina e tiramina com DnsCl

A reação descrita acima foi comparada aos procedimentos de alguns autores que utilizam hidróxido de amônio para eliminar o excesso de DnsCl (VIEITES et al., 1997; BOZKURT & ERKMEN, 2002; MAH et al., 2002). A 500,0 μ L da solução padrão 0,25 mg/mL da amina, foram adicionados 0,5 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio e 1,0 mL de DnsCl 5,0 mg/mL em acetona. A mistura foi homogeneizada e mantida a 40 °C por 1 h. Foram adicionados 100,0 μ L de NH₄OH 2,3% à mistura, seguido da (i) diluição com etanol, centrifugação e leitura; ou (ii) repouso a temperatura ambiente, por

30 min, antes da adição de etanol, centrifugação e leitura. Esta etapa foi realizada ao abrigo da luz com cinco repetições.

2.2.3.3 Determinação do tempo e temperatura de aquecimento ideais para a reação de histamina e tiramina com DnsCl

Foram analisados os parâmetros de tempo (40, 50 e 60 min) e temperatura de aquecimento (40 e 60 °C) da reação de histamina e tiramina com DnsCl. Após a reação, foi seguido o procedimento descrito acima sem adição de NH_4OH e os derivados foram analisados a 372 nm. Os testes foram feitos ao abrigo da luz em triplicata.

2.2.3.4 Avaliação da interferência de oito aminas bioativas no espectro dos derivados da histamina e da tiramina com DnsCl

Após a otimização da reação, foi verificada a interferência de oito aminas no espectro da tiramina e da histamina. Foi pipetado 100,0 μL da solução 1,0 mg/mL da amina e esta foi adicionada de 0,5 mL de solução saturada de NaHCO_3 . Foi adicionado 1,0 mL de DnsCl 5,0 mg/mL dissolvido em acetona, as amostras foram homogeneizadas e aquecidas por 40 min em banho-maria, à 60 °C. Após resfriamento, foram adicionados 8,0 mL de etanol e as amostras foram agitadas e centrifugadas a 3.354 g por 5 min. Foi realizada uma varredura no espectro de absorção das aminas derivadas entre 300 e 600 nm. Todo o procedimento foi realizado ao abrigo da luz. A absorvidade molar de cada derivado foi determinada utilizando a lei de Beer.

2.2.3.5 Avaliação da estabilidade dos derivados de histamina e tiramina com DnsCl na ausência e na presença de luz

Foi testada a estabilidade dos produtos da reação de histamina e tiramina com DnsCl, seguindo o procedimento descrito acima, ao abrigo da luz e exposto à luz, fazendo leituras da absorvância das aminas derivadas a 372 nm em intervalos de tempo por 2 h. A análise foi realizada com seis repetições.

2.2.3.6 Curva analítica dos derivados da histamina e tiramina com DnsCl

Foi preparada uma curva analítica para tiramina e histamina. Foram adicionados, em tubos de polietileno, 125,0; 187,0; 250,0; 375,0; 437,0 e 500,0 μL de solução padrão 0,5 mg/mL de histamina e 75,0; 150,0; 250,0; 300,0; 375,0 e 500,0 μL de solução padrão 0,5 mg/mL de tiramina. A reação foi realizada ao abrigo da luz, como descrito

anteriormente. Realizou-se a leitura da absorvância de seis repetições de cada concentração das aminas a 372 nm.

2.2.4 Análise dos dados

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETECÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA SEM DERIVAÇÃO NO ULTRAVIOLETA

Na figura III.3, é possível observar o espectro de absorção da histamina e tiramina. Histamina e tiramina apresentaram comprimento máximo de absorção em 220 nm. No entanto, neste comprimento de onda, outros componentes da matriz apresentam absorção (JOOSTEN & OLIEMAN, 1986) e com isto, os protocolos de purificação têm que ser mais longos, ou é necessário método para separação destes compostos.

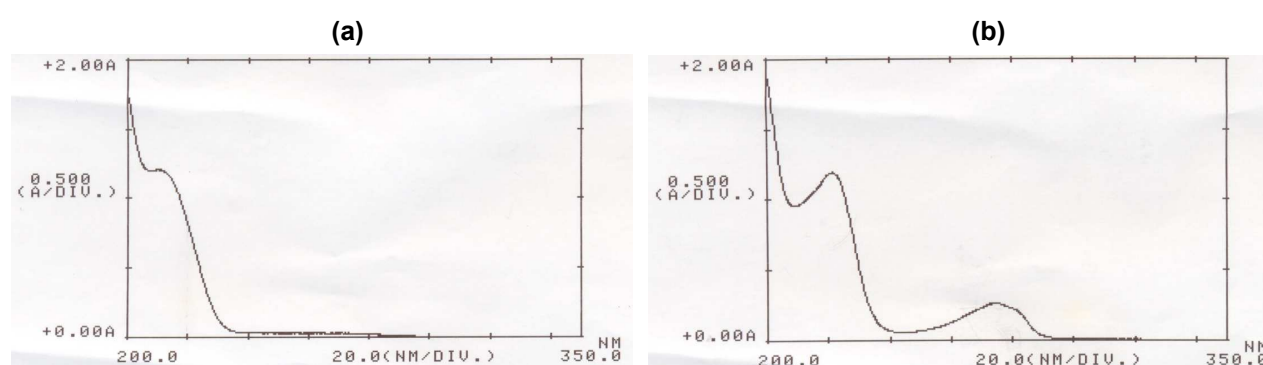


Figura III.3: Espectro de absorção da histamina (a) e tiramina (b) na região do ultravioleta na concentração de 20,0 $\mu\text{g/mL}$. Comprimentos máximos de absorção em 220 nm para histamina e em 220 e 275 nm para tiramina.

Tiramina apresentou uma banda com máximo de absorção em 275 nm e para esta amina foi feita uma curva analítica, apresentada na figura III.4. O coeficiente de determinação (r^2) da curva analítica da tiramina na faixa de concentração de 20,0 $\mu\text{g/mL}$ a

202,0 µg/mL para a substância pura foi baixo. Deve-se ainda reavaliar esta faixa de concentração e realizar teste de linearidade. Além disso, antes de se utilizar este procedimento para detecção e quantificação desta amina na matriz queijo parmesão ralado é necessário avaliar se os procedimentos de purificação e separação são suficientemente seletivos.

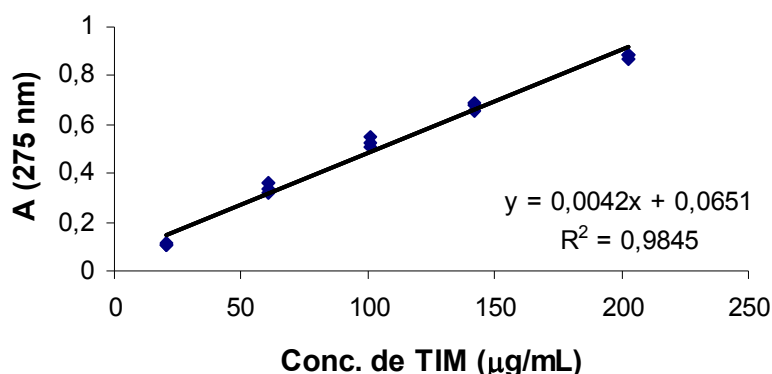


Figura III.4: Curva analítica da tiramina com leitura da absorvância em 275 nm em concentrações entre 20,0 e 202,0 µg/mL.

3.2 DERIVAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA COM NINIDRINA

3.2.1 Avaliação do meio que ocorre a reação das aminas com ninidrina

Ao se testar a condição inicial de reação com ninidrina dissolvida em água, com a solução em pH 7,0, observou-se formação de precipitado, após o aquecimento, com as aminas putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, agmatina, tiramina, feniletilamina e triptamina. Não foi observada a formação de precipitado apenas com histamina e serotonina. A reação de tiramina e histamina com ninidrina tamponada nos dois tipos de solução-tampão testados levou a formação de composto de cor lilás, com comprimentos de onda máximos em 568 e 402 nm. No entanto, também houve a formação de precipitado escuro nas duas situações, diferente do trabalho de PANASIUK et al. (1998), que utilizou solução aquosa de ninidrina para análise de aminoácidos em meio tamponado com fosfato em pH 7,0, e não relataram problemas.

Com ninidrina dissolvida em metilglicol, não houve a formação de precipitado com as aminas estudadas, sendo ideal a dissolução de ninidrina em metilglicol, ao invés de

água ou apenas de solução tampão. Provavelmente este é um dos motivos do metilglicol ser um dos solventes mais comuns para ninidrina (ZEE et al., 1981; JOOSTEN & OLIEMAN, 1986; LE BOUCHER et al., 1997; STANDARA et al., 1999; KOMPRDA et al., 2001).

As leituras de absorvância dos compostos formados a partir da reação da tiramina com ninidrina dissolvida em metilglicol em meio tamponado em pH 7,0 foram significativamente maiores que a reação em meio não tamponado. A adição de solução tampão foi importante para garantir o pH do meio após a neutralização da amostra.

3.2.2 Determinação do pH ideal para a reação de histamina e tiramina com ninidrina

O pH ideal para a derivação de histamina com ninidrina foi de 6,0 e para a tiramina 7,0 em ambos comprimentos de onda testados (tabela III.3). De acordo com JOHNSTON (1958), a reação deve ser realizada em meio neutro para ocorrer a reação, no entanto, há variação dos valores de pH entre 4,5 e 7,0 nos estudos descritos na literatura (LUKTON & OLCOTT, 1958; ZEE et al., 1981; PANASIUK et al., 1998).

Tabela III.3: Influência do pH na formação do derivado de histamina e tiramina com ninidrina

	Absorvância (%CV)					
	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,0	pH 10,0
Histamina						
568 nm	0,222 c (9)	0,309 a (5)	0,248 b (3)	0,138 d (2)	0,123 d (8)	0,054 e (1)
402 nm	0,273 b (8)	0,358 a (5)	0,293 b (3)	0,243 c (1)	0,232 c (5)	0,150 d (1)
Tiramina						
568 nm	0,003 f (<0,01)	0,313 b (2)	0,424 a (6)	0,202 d (6)	0,240 c (2)	0,042 e (9)
402 nm	0,026 d (10)	0,411 b (2)	0,604 a (5)	0,414 b (4)	0,404 b (2)	0,146 c (9)

CV: coeficiente de variação. Valores para cada linha (a-f) com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Duncan; $p \leq 0,05$).

Estes valores estão de acordo com o mecanismo proposto para a reação de aminas primárias com ninidrina (figura 3), que é catalisada por ácido. No entanto, esta acidez não pode ser elevada, senão haverá protonação extensa do grupo amino, diminuindo a concentração do nucleófilo necessário (SOLOMONS, 1996).

3.2.3 Determinação do tempo e temperatura de aquecimento ideais e da influência da concentração de ninidrina na reação com histamina e tiramina

Na tabela III.4, pode-se observar a absorvância dos derivados da histamina e da tiramina a 568 e 402 nm, após reação com ninidrina em diferentes concentrações e tempo de aquecimento. Foi observada alteração na cor da solução para um tom marrom após 30 min de aquecimento dos derivados tanto da histamina, como da tiramina. Desta forma, para evitar a formação de compostos secundários, foi selecionado o tempo de aquecimento de 20 min, apesar do derivado da tiramina a 568 nm ter apresentado absorção significativamente maior com 30 min. Além disso, com 20 min de aquecimento, não houve diferença significativa entre as duas concentrações de ninidrina testadas.

Tabela III.4: Influência da concentração de ninidrina adicionada e do tempo de aquecimento na formação dos derivados da histamina e da tiramina com leitura da absorvância a 568 e 402 nm

Tempo de aquecimento (min)	Absorvância (%CV)			
	Ninidrina 0,5 mg/mL		Ninidrina 1,0 mg/mL	
	568 nm	402 nm	568 nm	402 nm
Histamina				
5	0,658 b (17)	0,871 c (5)	0,716 c (12)	0,851 c (12)
10	1,103 a (2)	1,322 b (2)	1,186 b (15)	1,410 b (13)
20	1,159 a (18)	1,398 ab (17)	1,296 ab (2)	1,525 ab (2)
30	1,293 a (11)	1,544 a (11)	1,457 a (7)	1,701 a (8)
Tiramina				
5	1,453 d,x (4)	1,891 c,x (4)	1,267 c,y (6)	1,663 b,y (6)
10	1,906 c (1)	2,373 b (2)	1,930 b (1)	2,388 a (1)
20	2,076 b (5)	2,468 a (2)	2,035 a (3)	2,445 a (1)
30	2,277 a,x (1)	2,491 a (0)	2,085 a,y (1)	2,448 a (0,5)

CV: coeficiente de variação. Valores para cada coluna (a-d) ou linha (x-y) com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Duncan; $p \leq 0,05$).

Na tabela III.5, pode-se observar a absorvância dos derivados da histamina e da tiramina a 568 e 402 nm, após reação com ninidrina em diferentes temperaturas de aquecimento. A leitura da absorvância a 568 nm do derivado da tiramina apresentou

diferença significativa em relação à temperatura de aquecimento da reação, sendo mais adequado utilizar temperatura de ebulição por 20 min. Estes resultados estão de acordo com as variações de tempo e temperatura mais comuns descritos na literatura para reações de ninidrina com algumas aminas e aminoácidos (LUKTON & OLCOTT, 1958; PANASIUK et al., 1998; STARCHER, 2001).

Tabela III.5: Influência da temperatura de aquecimento durante 20 min na formação dos derivados da histamina e da tiramina com ninidrina com leitura da absorvância a 568 e 402 nm

Temperatura (°C)	Absorvância (%CV)			
	Histamina		Tiramina	
	568 nm	402 nm	568 nm	402 nm
90	1,114	1,317	1,928 b	2,372
	(3)	(3)	(2)	(2)
95	1,127	1,330	1,897 b	2,331
	(2)	(2)	(8)	(7)
Ebulição	1,172	1,397	2,101 a	2,495
	(14)	(13)	(1)	(0,3)

Valores para cada coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$). Valores sem indicação de letras não apresentaram diferença significativa (Teste de Duncan, $p \geq 0,05$).

3.2.4 Avaliação da interferência de oito aminas bioativas no espectro dos derivados da histamina e da tiramina com ninidrina

A tiramina e a histamina apresentaram absorção máxima em 568 e 402 nm (figura III.5). As oito aminas analisadas apresentaram perfis de absorção máxima semelhantes aos da tiramina e histamina (figura III.6). Estes resultados corroboram o mecanismo da reação proposto por PETROVSKAIA et al. (2001), representado na figura 3, que demonstra a eliminação do grupo R ligado ao grupo amino, após reação da ninidrina com uma amina. Apenas serotonina apresentou o perfil ligeiramente diferente com absorção máxima em 560 e 383 nm.

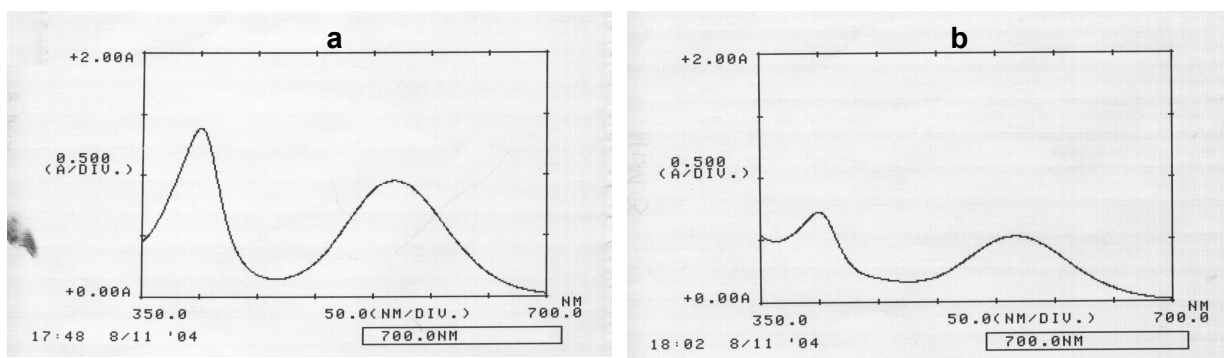


Figura III.5: Espectro de absorção, na região do visível, dos derivados da tiramina (a) e histamina (b) com ninidrina na concentração de 40,0 µg/mL e 55,0 µg/mL, respectivamente.

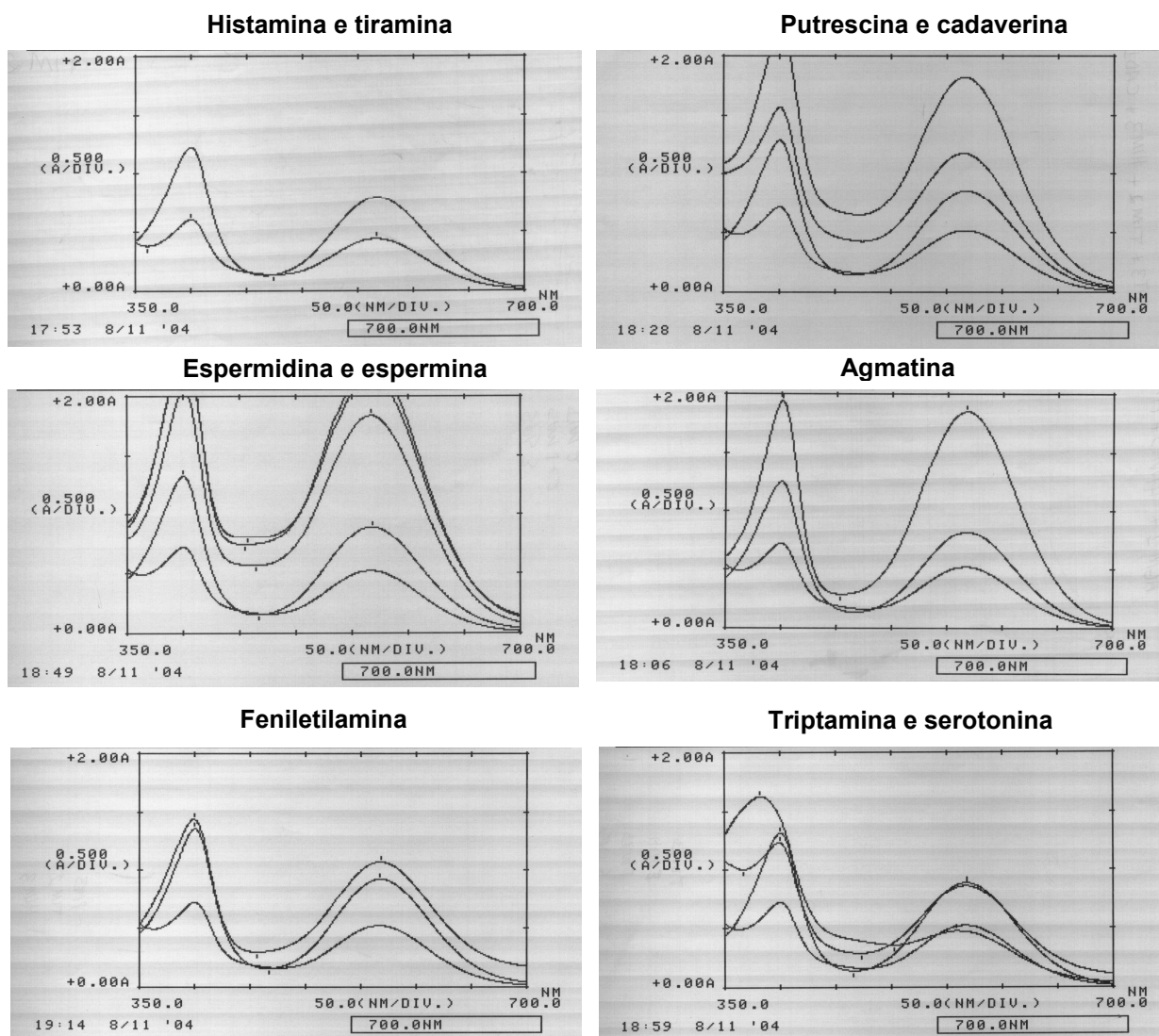


Figura III.6: Espectro de absorção, na região do visível, dos derivados da ninidrina com tiramina e histamina sobrepostos aos espectros de putrescina e cadaverina, espermidina e espermina, agmatina, feniletilamina, triptamina e serotonina.

De acordo com o mecanismo de reação proposto por PETROVSKAIA et al. (2001), o composto final de todas as reações foi o mesmo. Desta forma, o cálculo da absorvidade molar de cada amina bioativa derivada com ninidrina, indica o rendimento da reação de derivação e está indicada na tabela III.6. Pode-se observar na figura III.7, que as aminas apresentam uma tendência de maior rendimento a medida que o número de grupos amino aumentam, mas também se agrupam por características funcionais dos grupamentos associados, como fenóis.

Tabela III.6: Rendimento da derivação das aminas bioativas com ninidrina, calculado pela absorvidade molar, obtida pela Lei de Beer.

Aminas	Absorvidade molar ($10^3 \cdot \text{L}/\text{cm} \cdot \text{mol}$)	
	568 nm	402 nm
Histamina	0,94	1,66
Tiramina	2,95	5,26
Espermina	7,96	12,54
Espermidina	7,20	10,43
Agmatina	4,38	5,90
Putrescina	4,54	6,82
Cadaverina	5,88	8,98
Feniletilamina	2,29	5,22
Triptamina	2,46	4,50
Serotonina	1,53	4,29

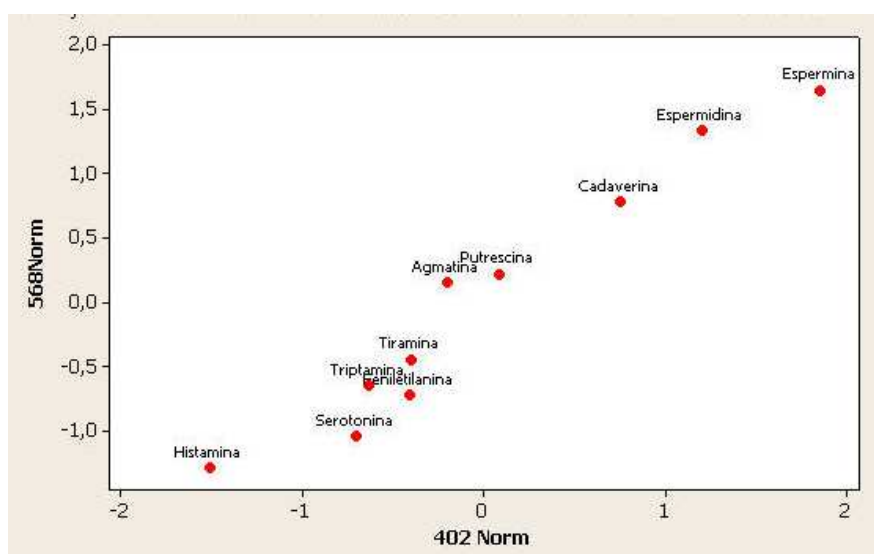


Figura III. 7: Relação entre o rendimento da derivação das aminas bioativas com ninidrina a 568 e 402 nm, calculado pela absorvidade molar, obtida pela Lei de Beer.

3.2.5 Avaliação da estabilidade dos derivados de histamina e tiramina com ninidrina

Os derivados da ninidrina com histamina e tiramina se apresentaram estáveis por 100 min, exceto com histamina na concentração 5,0 µg/mL, como pode ser observado na tabela III.7. Apesar de terem sido observadas diferenças significativas para o derivado da histamina, os valores de absorvância para cada tempo de leitura apresentaram variações numéricas de apenas 0,002 a 0,006, que estão próximas da faixa de sensibilidade do equipamento utilizado. Não foi encontrado relato anterior sobre estabilidade dos derivados de ninidrina com aminas bioativas. Foi observado, em um estudo com derivados de leucina e de uma mistura de aminoácidos, estabilidade destes por 30 min, após leitura a cada 30 s da absorvância dos derivados (PANASIUK et al., 1998).

Tabela III.7: Absorvância da histamina e da tiramina a 568 e 402 nm, em diferentes concentrações, imediatamente, 45 e 100 min após reação com ninidrina

Concentração (µg/mL)	Absorvância (%CV)					
	Tempo após a reação (min) / diferentes comprimentos de onda					
	0		45		100	
	568 nm	402 nm	568 nm	402 nm	568 nm	402 nm
Histamina						
5	0,017 a (6)	0,054 (5)	0,018 a (9)	0,055 (5)	0,015 b (7)	0,052 (5)
10	0,103 (9)	0,167 a (2)	0,103 (9)	0,165 ab (2)	0,101 (8)	0,161 b (2)
20	0,333 (9)	0,442 (6)	0,332 (9)	0,435 (6)	0,329 (9)	0,428 (7)
40	1,195 (13)	1,415 (13)	1,182 (13)	1,388 (13)	1,176 (13)	1,377 (13)
Tiramina						
5	0,051 (19)	0,138 (5)	0,047 (20)	0,133 (5)	0,046 (21)	0,132 (5)
10	0,203 (27)	0,395 (12)	0,199 (27)	0,388 (12)	0,198 (28)	0,384 (12)
20	0,647 (19)	0,952 (6)	0,641 (19)	0,942 (6)	0,639 (19)	0,936 (6)
40	2,000 (1)	2,428 a (1)	1,981 (2)	2,415 ab (1)	1,970 (2)	2,399 b (1)

CV: coeficiente de variação. Valores para cada linha com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$). Valores sem indicação de letras não apresentaram diferença significativa (Teste de Duncan, $p \geq 0,05$).

3.2.6 Curva analítica dos derivados da histamina e tiramina com ninidrina

A relação linear entre as absorvâncias a 568 e a 402 nm e as concentrações dos derivados de ninidrina com histamina na faixa de concentração de 5,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ e com tiramina na faixa de 3,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ está ilustrada nas figuras III.8 e III.9, respectivamente, junto à equação da reta e ao coeficiente de determinação (r^2). O coeficiente de determinação da curva analítica dos derivados da histamina e da tiramina com ninidrina foram maiores em 402 nm. Os limites de detecção de ambas aminas foram menores em 402 nm. Desta forma, a resposta dos derivados neste comprimento de onda foi melhor e este pode ser selecionado para quantificação de histamina e tiramina, sendo necessária, ainda, a avaliação da presença de interferentes na matriz da amostra.

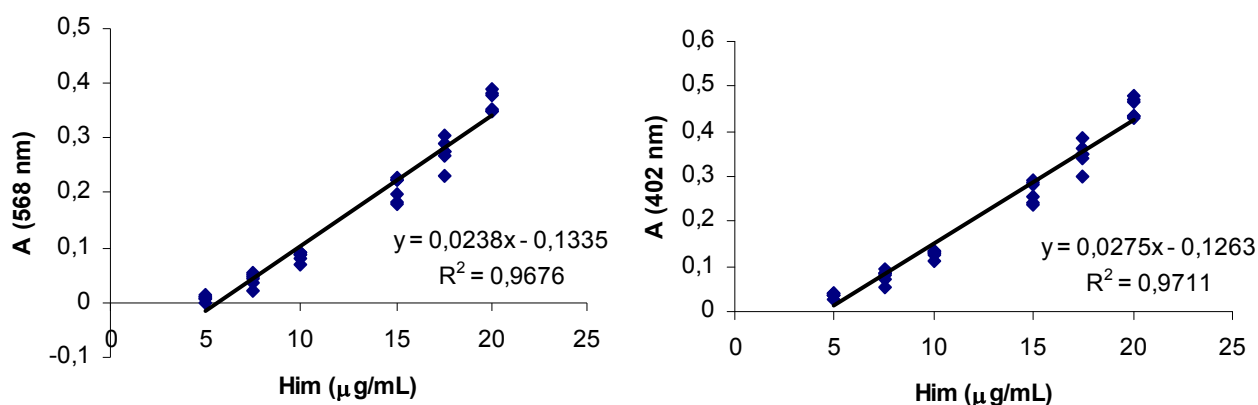


Figura III.8: Curvas analíticas do derivado da histamina com ninidrina em concentrações de 5,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ com leitura da absorvância a 568 e 402 nm.

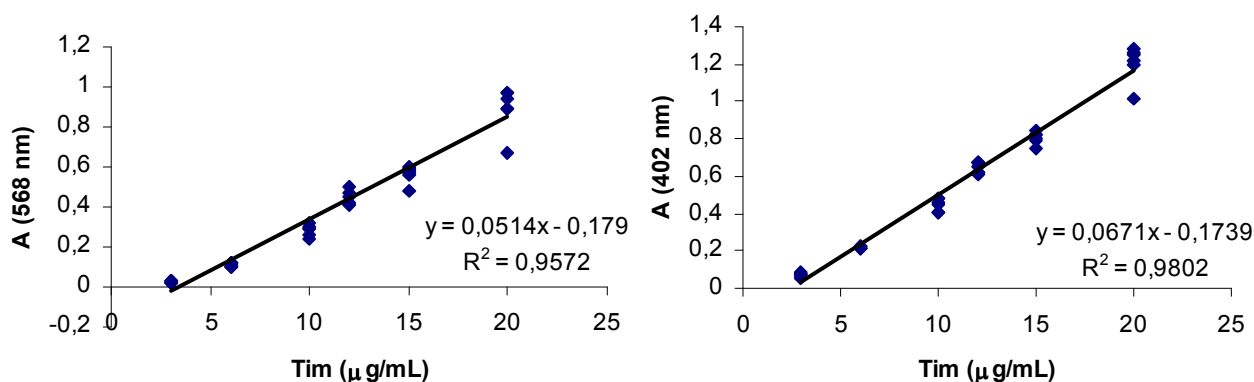


Figura III.9: Curvas analíticas do derivado da tiramina com ninidrina em concentrações de 3,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ com leitura da absorvância a 568 e 402 nm.

3.3 DERIVAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA COM CLORETO DE DANSILA

3.3.1 Influência do solvente na derivação de histamina e tiramina com DnsCl

Após a reação com DnsCl, observou-se a formação de um precipitado gelatinoso que sedimentou após a centrifugação. Ao se adicionar água, foi observado que mesmo após a centrifugação, o líquido permaneceu turvo, não sendo adequada a sua utilização para leitura espectrofotométrica. Na mistura adicionada de etanol, o precipitado formado ficou bem sedimentado após a centrifugação e a solução ficou límpida. Desta forma, este solvente foi escolhido para a diluição. Histamina apresentou absorção máxima em 373 nm e tiramina em 371 nm na solução diluída com etanol.

3.3.2 Influência da adição de NH₄OH após a reação de histamina e tiramina com DnsCl

Vários pesquisadores descreveram a necessidade de retirar o excesso de DnsCl, quando utilizam cromatografia, pois este pode interferir na separação de algumas amins (SHAKILA et al., 2001; MAH et al., 2002). Esta etapa geralmente é feita pela adição de NH₄OH (VINCE & ANTONELLI, 2002; GAYA et al., 2005). Na tabela III.8, pode-se observar a influência da adição de NH₄OH após a reação de histamina e tiramina com DnsCl. Após o tempo de espera, descrito por VIEITES et al. (1997) e BOZKURT & ERKMEN (2002), o valor da absorvância foi semelhante ao valor sem adição de NH₄OH. Desta forma, neste procedimento não foi necessário retirar o excesso de DnsCl, como descrito por DUGO et al. (2006).

Tabela III.8: Absorvância da histamina e da tiramina a 372 nm, após reação com cloreto de dansila sem e com adição de NH₄OH em diferentes condições

Reação	Absorvância a 372 nm (%CV)	
	Histamina	Tiramina
Sem adição de NH ₄ OH	0,516 b (4)	0,351 b (8)
NH ₄ OH sem repouso	1,100 a (9)	0,718 a (5)
NH ₄ OH com repouso	0,500 b (3)	0,355 b (8)

CV: coeficiente de variação. Valores para cada coluna com uma mesma letra não são significativamente diferentes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$).

3.3.3 Determinação do tempo e temperatura de aquecimento ideais para a reação de histamina e tiramina com DnsCl

A influência da temperatura e do tempo de aquecimento na formação dos derivados de DnsCl com tiramina e histamina pode ser observada na tabela III.9. A formação de derivado do DnsCl com histamina não foi influenciada pelo tempo e temperatura de aquecimento testados. Para tiramina, foi observada maior absorvância na mistura formada, a 60 °C, e não houve diferença entre os tempos de aquecimento. Desta forma, as condições ideais da reação para tiramina foram o menor tempo (40 min), à 60 °C, e para padronizar as condições de trabalho, foram utilizados os mesmos valores para histamina.

Comparações de cinco variações de tempo e temperatura (30 min, 1 h e 2 h à 40 °C; 1 h à 55 °C; e 16 h à temperatura ambiente) também não apresentaram diferença na reação da tiramina e histamina com cloreto de dansila (LAPA-GUIMARÃES & PICKOVA, 2004). Outros estudos selecionaram condições semelhantes a este trabalho com temperaturas de 60 e 65 °C por 12 a 25 min (COBO & SILVA, 1999; CASAL et al., 2002).

Tabela III.9: Influência do tempo e da temperatura de aquecimento na formação dos derivados da histamina e da tiramina com cloreto de dansila com leitura da absorvância a 372 nm

Tempo de aquecimento (min)	Absorvância a 372 nm (%CV) / Temperatura	
	40 °C	60 °C
Histamina		
40	0,713 (7)	0,818 (1)
50	0,762 (3)	0,801 (4)
60	0,841 (11)	0,767 (5)
Tiramina		
40	0,421 b (5)	0,508 a (6)
50	0,424 b (5)	0,474 a (2)
60	0,441 b (4)	0,489 a (3)

CV: coeficiente de variação. Valores para cada linha com uma mesma letra não são significativamente diferentes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$). Valores sem indicação de letras não apresentaram diferença significativa (Teste de Duncan, $p \geq 0,05$).

3.3.4 Avaliação da interferência de oito aminas bioativas no espectro dos derivados da histamina e da tiramina com DnsCl

As oito aminas analisadas apresentaram perfis e comprimentos de onda de absorção máxima semelhantes aos da tiramina e histamina. Desta forma, seriam necessários métodos de purificação e separação para determinação seletiva das aminas (figura III.10).

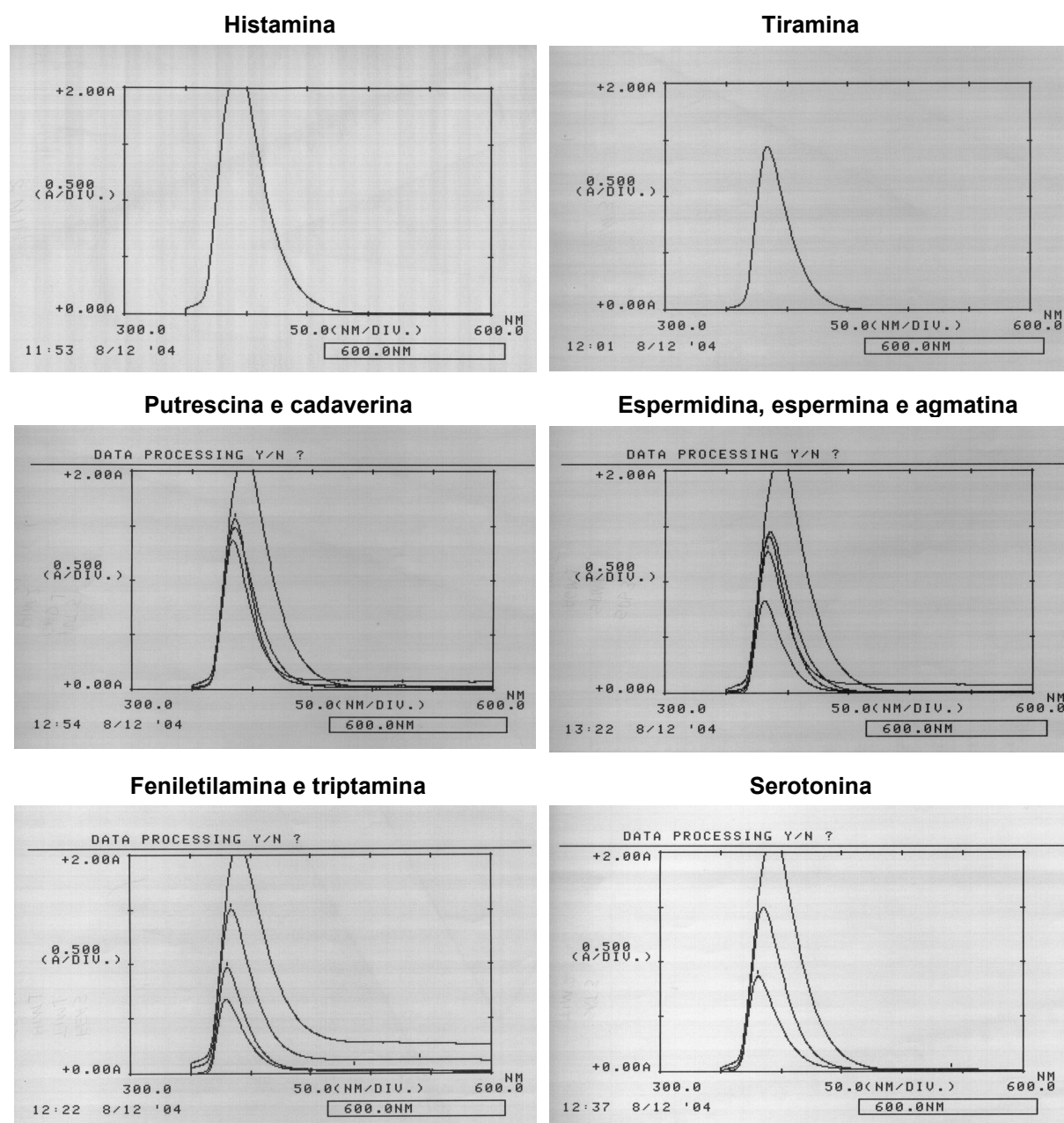


Figura III.10: Espectro de absorção, na região do uv-visível, dos derivados de tiramina e histamina com cloreto de dansila sobrepostos aos espectros dos derivados de putrescina e cadaverina, espermidina e espermina, agmatina, feniletilamina, triptamina e serotonina.

A absorptividade molar das aminas bioativas derivadas com ninidrina está indicada na tabela III.10. Na condição selecionada, a histamina apresentou absorptividade semelhante a tiramina. Para os derivados de cloreto de dansila, o número de grupos amino da substância não foi determinante no valor da absorptividade molar. Apesar da poliamina espermina ter apresentado o maior valor, não houve distinção clara entre as monoaminas e as diaminas. Agmatina, feniletilamina e triptamina apresentaram os menores valores.

Tabela III.10: Absortividade molar em 372 nm, calculada pela Lei de Beer, das aminas bioativas derivadas com cloreto de dansila

Aminas	Absortividade molar (10³.L/cm.mol)
Histamina	5,95
Tiramina	5,28
Espermina	9,61
Espermidina	6,10
Agmatina	2,45
Putrescina	4,35
Cadaverina	5,23
Feniletilamina	2,78
Triptamina	2,11
Serotonina	5,20

3.3.5 Avaliação da estabilidade dos derivados de histamina e tiramina com DnsCl na ausência e na presença de luz

Na tabela III.11, pode-se observar a estabilidade dos derivados de DnsCl com histamina e tiramina na presença e ausência de luz. A absorvância dos derivados de histamina e tiramina foi significativamente maior na reação efetuada na ausência de luz. Nem todos os trabalhos têm descrito se a reação foi realizada ou não na ausência de luz, no entanto, isto deve ser destacado, pois pode haver uma diferença muito grande ao realizar o procedimento sem este cuidado. Alguns autores realizam etapas de purificação após a dansilação para análise cromatográficas (NAGUIB et al., 1995; CASAL et al.,

2002; LOUKOU & ZOTOU, 2003), sendo importante ressaltar que pode haver perdas nesta etapa devido à incidência de luz nos derivados.

Tabela III.11: Absorvância da histamina e da tiramina a 372 nm, após reação com cloreto de dansila na ausência e na presença da luz, avaliada em diversos intervalos de tempo

Amina / Tempo após a reação (min)	Absorvância a 372 nm (%CV)	
	Na ausência da luz	Na presença da luz
Histamina		
0	0,513 a,x (3)	0,398 a,y (4)
30	0,505 a,x (3)	0,393 a,y (4)
75	0,478 b,x (3)	0,389 a,y (4)
105	0,456 c,x (4)	0,368 b,y (4)
Tiramina		
0	0,367 x (13)	0,249 y (7)
30	0,358 x (13)	0,242 y (7)
75	0,330 x (13)	0,238 y (7)
105	0,311 x (14)	0,221 y (8)

CV: coeficiente de variação. Valores para cada coluna (a-c) ou linha (x-y) com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$; teste de Duncan).

Como pode ser observado na tabela III.11, o derivado de histamina se apresentou estável por 30 min no procedimento realizado na ausência da luz. Após 75 min de análise, houve uma redução de 6,8% de absorvância deste derivado e de 11,1% após 105 min. O derivado de tiramina, na ausência da luz, se apresentou estável, sem variação significativa entre a absorvância no tempo inicial e em 105 min.

3.3.6 Curva analítica dos derivados da histamina e tiramina com DnsCl

A relação linear entre a absorvância a 372 nm e a concentração dos derivados de DnsCl com histamina na faixa de concentração 6,3 a 25,0 $\mu\text{g/mL}$ e com tiramina na faixa 3,8 a 25,0 $\mu\text{g/mL}$ está ilustrada na figura III.11, junto à equação da reta e ao coeficiente de determinação (r^2).

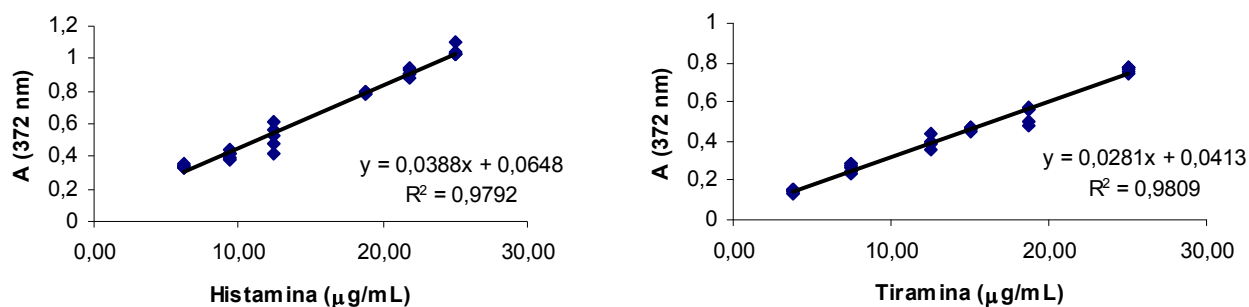


Figura III.11: Curva analítica dos derivados de dansila da histamina, em concentrações de 5,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$, e da tiramina, em concentrações de 3,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$, com leitura da absorvância a 372 nm.

4 CONCLUSÕES

Histamina e tiramina apresentaram absorção em 220 nm sem a necessidade de derivação. Tiramina também apresentou absorção em 275 nm com linearidade na faixa de concentração de 20,0 a 202,0 $\mu\text{g/mL}$. No entanto nestes comprimentos de onda, os protocolos de purificação e separação devem garantir a seletividade da análise, no caso de matrizes complexas.

Com as condições de reação otimizadas, os derivados da tiramina e da histamina com ninidrina apresentaram comprimentos de onda de absorção máxima em 568 e 402 nm e as oito aminas analisadas apresentaram perfis e comprimentos de onda de absorção máxima semelhantes. Estas substâncias permaneceram estáveis por 100 min.

Com as condições de reação otimizadas, os derivados da histamina e tiramina com cloreto de dansila apresentaram comprimento de onda de absorção máxima em 372 nm, e as oito aminas analisadas apresentaram perfis e absorção semelhantes. Os derivados da tiramina e da histamina com DnsCl permaneceram estáveis por mais de uma hora ao abrigo da luz. A absorvância dos derivados de histamina e tiramina foi significativamente maior na reação efetuada na ausência de luz. Desta forma, é necessário trabalhar com os derivados sempre na ausência da luz, para evitar perda de sensibilidade e variação da análise.

Nenhum dos dois procedimentos de derivação foi específico para histamina e tiramina. Desta forma, seriam necessários métodos de purificação e separação para determinação de histamina e tiramina. A derivação com ninidrina é um procedimento mais

simples e os produtos são mais estáveis que a derivação com DnsCl. No entanto, outros parâmetros como limite de detecção e de quantificação devem ser avaliados para melhor comparação.

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS NA PURIFICAÇÃO POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE HISTAMINA E TIRAMINA EM EXTRATOS DE QUEIJO PARMESÃO RALADO

RESUMO

A purificação de histamina e tiramina de extratos de queijos é necessária para a determinação destas por espectrofotometria de absorção molecular. Este trabalho teve como objetivo avaliar a purificação seletiva de histamina e tiramina em extratos de queijo parmesão ralado por extração líquido-líquido. Para isto foi pesquisada a influência do tipo (ácido e alcalino) e do pH do extrato de queijo parmesão ralado na recuperação de histamina e tiramina durante a purificação por extração líquido-líquido com quatro solventes orgânicos (éter etílico, *n*-butanol, *n*-butanol:clorofórmio 1:1, acetato de etila), na presença de aminas bioativas interferentes. O extrato ácido foi mais eficiente para a maioria das aminas na purificação com éter etílico e não houve diferença significativa para a maioria das aminas com os outros solventes. No geral, a eficiência da purificação com os solventes estudados foi menos eficiente em pH 9,0. No entanto, para histamina e tiramina, as recuperações com *n*-butanol e éter etílico foram significativamente menores em pH 13,0. Uma avaliação dos resultados gerais de recuperação das aminas demonstra que diferentes solventes apresentaram diferente seletividade pelas aminas. Foi testada ainda a purificação de histamina e tiramina por extração sólido-líquido com éter etílico associado a um tipo de terra diatomácea (Extrelut®). No entanto, este método não foi eficiente, com baixa recuperação das aminas de interesse. Apesar da extração líquido-líquido ser um método simples, é também trabalhoso e não foi eficiente na purificação seletiva de histamina e tiramina.

Palavras-chave: Queijo parmesão ralado, aminas bioativas, extração líquido-líquido.

1 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros que influenciam e a eficácia da purificação seletiva de histamina e tiramina de extratos de queijo parmesão ralado por extração líquido-líquido, considerando a recuperação de histamina e tiramina e a eliminação das aminas interferentes. Os objetivos específicos foram (i) verificar a influência do tipo de extrato na purificação de histamina, tiramina e oito aminas interferentes por extração com diferentes solventes orgânicos; (ii) verificar a influência do pH na purificação de aminas por extração com diferentes solventes orgânicos; (iii) comparar a eficiência de alguns solventes orgânicos em recuperar as aminas; e (iv) verificar e comparar a eficiência de purificação de histamina, tiramina e outras oito aminas por partição utilizando Extrelut® como suporte sólido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

As amostras de queijo parmesão ralado foram adquiridas, no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. Uma marca ao acaso foi selecionada e embalagens do mesmo lote de queijo parmesão ralado foram agrupadas e homogeneizadas em um *pool* de 200 g para estudar o efeito dos procedimentos de extração na recuperação de aminas. Amostras sem adição de padrão foram utilizadas como matriz em alguns experimentos, enquanto amostras adicionadas de solução padrão contendo dez aminas nas concentrações de 5,0 e 10,0 mg/100 g de queijo foram utilizadas em outros. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.1.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto os solventes utilizados na CLAE (acetonitrila e metanol), que foram de grau cromatográfico. A água ultrapura foi obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Os padrões das aminas bioativas histamina (HIM, dicloridrato), tiramina (TIM, cloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), espermidina (EPD, tricloridrato), agmatina (AGM, complexo sulfato creatinina), putrescina (PUT, dicloridrato), cadaverina (CAD, dicloridrato), 2-feniletilamina (FEA, cloridrato), triptamina (TRM) e 5-hidroxitriptamina (serotonina – SRT, cloridrato) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). *orto*-Ftalaldeído também foi adquirido da Sigma.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Influência do tipo de extrato na purificação por extração líquido-líquido

2.2.1.1 Extração ácida e alcalina

Amostras de queijo parmesão ralado (2,0000 g) foram homogeneizadas com 7,0 mL de ácido sulfosalicílico 12,0 g/100 mL (BUTS et al., 1995) ou 10,0 mL de tampão borato, pH $10,2 \pm 0,2$ (JALON et al., 1983) em mesa agitadora orbital a 250 rpm por 10 min. A mistura foi centrifugada (11.180 g; 4 °C; 21 min) e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo. O resíduo sólido foi extraído mais duas vezes com 7,0 mL de ácido ou uma vez com 10,0 mL do tampão borato pelo mesmo procedimento. Os filtrados foram combinados e os volumes foram completados para 25,00 mL.

2.2.1.2 Extração líquido-líquido

Quatro métodos baseados na extração líquido-líquido de aminas com solventes orgânicos utilizando os extratos ácido e básico foram comparados quanto à porcentagem de recuperação. Os experimentos com cada solvente foram realizados em triplicata em condições de repetibilidade (mesma amostra, reagentes e dia de análise). Os extratos obtidos antes e após a partição foram analisados quanto aos teores de aminas por CLAE com par iônico (VALE & GLÓRIA, 1997).

À uma alíquota (5,0 mL) de cada extrato foi adicionado NaOH 5,0 mol/L para alcalinizar (pH 12,0) e carbonato de sódio até saturação. Estes extratos foram purificados com extração com éter etílico, *n*-butanol, *n*-butanol-clorofórmio (1:1) ou acetato de etila,

como descritos a seguir. Na extração com acetato de etila, foi utilizada uma alíquota de 10,0 mL.

a) *Éter etílico*: o extrato alcalinizado e saturado foi particionado com três porções de 10,0 mL de éter etílico. A camada etérea foi evaporada sob pressão reduzida a 40 °C até eliminação do éter em evaporador rotatório à vácuo (Büchi R-114 acoplado ao banho-maria Büchi B-480, Suíça). O resíduo foi reconstituído com HCl 0,1 mol/L e o volume foi completado para 10,00 mL (VALE & GLÓRIA, 1997).

b) *n-Butanol ou n-Butanol-clorofórmio (1:1)*: o extrato alcalinizado e saturado foi particionado com três porções de 6,0 mL do solvente orgânico. Os extratos butanólicos foram combinados e adicionados de 5,0 mL de HCl 0,1 mol/L. Após agitação vigorosa, a fase ácida foi recolhida em balão volumétrico de 10,00 mL. Este procedimento foi repetido mais uma vez e o volume do balão foi completado para 10,00 mL (VALE & GLÓRIA, 1997; SHALABY, 2000).

c) *Acetato de etila*: o extrato alcalinizado e saturado foi extraído com três porções de 20,0 mL de acetato de etila. As camadas orgânicas foram combinadas e foram adicionados 10,0 mL de HCl 0,1 mol/L. Após agitação vigorosa, a fase ácida foi recolhida e este procedimento foi repetido mais uma vez com volume final completado para 25,00 mL (SEN, 1969; JALON et al., 1983).

2.2.2 Comparação da eficiência e seletividade da extração líquido-líquido de extratos de queijo parmesão ralado com quatro solventes em diferentes valores de pH

O extrato básico obtido com tampão borato pH $10,2 \pm 0,2$ foi particionado em três valores de pH (9,0; 10,0 e 13,0) com quatro solventes orgânicos. A eficiência da purificação das aminas foi avaliada pelo método de adição de padrão em duas concentrações. Controle e amostras adicionadas, na etapa de extração, com duas concentrações de dez aminas (5,0 e 10,0 mg de cada amina por 100 g de amostra) foram utilizados. Os procedimentos de cada solvente foram realizados em triplicata em condições de repetibilidade e os extratos obtidos foram analisados quanto aos teores de aminas por CLAE com par iônico (VALE & GLÓRIA, 1997).

Uma alíquota (5,0 mL) do extrato de tampão borato teve seu pH ajustado com NaOH 2,0 mol/L ou HCl 1,0 mol/L e, em seguida, foram adicionados 2,00 g de NaCl. A mistura foi particionada com éter etílico, *n*-butanol, clorofórmio e acetato de etila. Na purificação com éter etílico, *n*-butanol e acetato de etila, o procedimento foi o mesmo

descrito anteriormente, exceto pela porção de 20,0 mL de éter etílico e de 10,0 mL de *n*-butanol. Na purificação com clorofórmio, o extrato alcalino foi particionado com três porções de 20,0 mL do solvente orgânico. As fases orgânicas foram combinadas e 5,0 mL de HCl 0,1 mol/L foram adicionados. Após agitação vigorosa, a fase ácida foi recolhida e este procedimento foi repetido mais uma vez.

2.2.3 Comparação da purificação de aminas com éter etílico por extração líquido-líquido sem e com suporte sólido

Incorporou-se 3,0 mL do extrato de tampão borato em 3,0 g de terra diatomácea Extrelut® (Merck, Darmstadt, Alemanha). O valor do pH do extrato não foi ajustado e foi em média $9,4 \pm 0,3$. A mistura foi transferida para uma seringa de polietileno (12 mm de diâmetro interno) com a abertura inferior tampada com lã de vidro. As aminas foram eluídas com 60,0 mL de éter etílico e a camada etérea foi evaporada sob pressão reduzida a 40 °C em evaporador rotatório. O resíduo foi dissolvido em HCl 0,1 mol/L e o volume foi completado para 10,00 mL (adaptado de BILIC, 1996). Este procedimento foi comparado ao procedimento descrito no item anterior para purificação do extrato com éter etílico com pH ajustado em 9,0 e 10,0.

A influência do Extrelut® na eficiência da purificação de aminas com éter etílico foi avaliada pela adição de padrão no queijo ralado com duas concentrações de aminas (5,0 e 10,0 mg de cada amina por 100 g de amostra). Os procedimentos foram realizados em triplicata.

2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE

2.3.1 Separação e determinação de aminas bioativas por CLAE com par iônico

Os extratos investigados foram filtrados em membranas (13 mm de diâmetro e 0,45 μm de tamanho do poro) tipo HAWP para solvente aquoso (Millipore Corp. Milford, MA, EUA) e injetados em cromatógrafo líquido de alta eficiência. As aminas foram separadas utilizando o mesmo sistema descrito no capítulo I por CLAE de fase reversa com par iônico e quantificadas fluorometricamente a 340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente, após derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído.

2.3.2 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de queijo utilizadas neste estudo continham todas as aminas investigadas, exceto serotonina. Histamina e tiramina estavam presentes em teores de 13,16 e 21,21 mg/100 g, respectivamente. As outras aminas que poderiam interferir na análise de histamina e tiramina foram as poliaminas espermidina e espermina (0,15 e 0,06 mg/100 g, respectivamente), e as aminas biogênicas putrescina (7,87 mg/100 g), cadaverina (21,48 mg/100 g), feniletilamina (0,98 mg/100 g), triptamina (0,68 mg/100 g) e agmatina (0,13 mg/100 g). Estes resultados estão de acordo com os trabalhos anteriores em queijo (tabela I.1), nos quais tiramina, histamina, putrescina e cadaverina foram as principais aminas, enquanto serotonina estava geralmente presente em baixo teores ou não foi detectada (VALE & GLÓRIA, 1998; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000; PIMENTEL et al., 2001).

3.1 INFLUÊNCIA DA EXTRAÇÃO ÁCIDA E ALCALINA DE QUEIJO PARMESÃO RALADO NA PURIFICAÇÃO DE AMINAS POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO UTILIZANDO QUATRO SOLVENTES DIFERENTES

A eficiência da purificação de histamina e tiramina de extratos ácido e alcalino com quatro solventes diferentes está indicada na figura IV.1. Histamina foi melhor extraída com éter etílico quando o extrato era alcalino e também com *n*-butanol:clorofórmio (1:1) independente do extrato. Tiramina foi melhor extraída com *n*-butanol e *n*-butanol:clorofórmio (1:1) independente do extrato utilizado. Entretanto, nenhuma das combinações utilizadas foram capazes de purificar seletivamente histamina e tiramina. Além disso, as combinações que apresentaram boas recuperações durante a purificação de histamina e tiramina também permitiram a extração de outras aminas presentes no queijo (tabela IV.1).

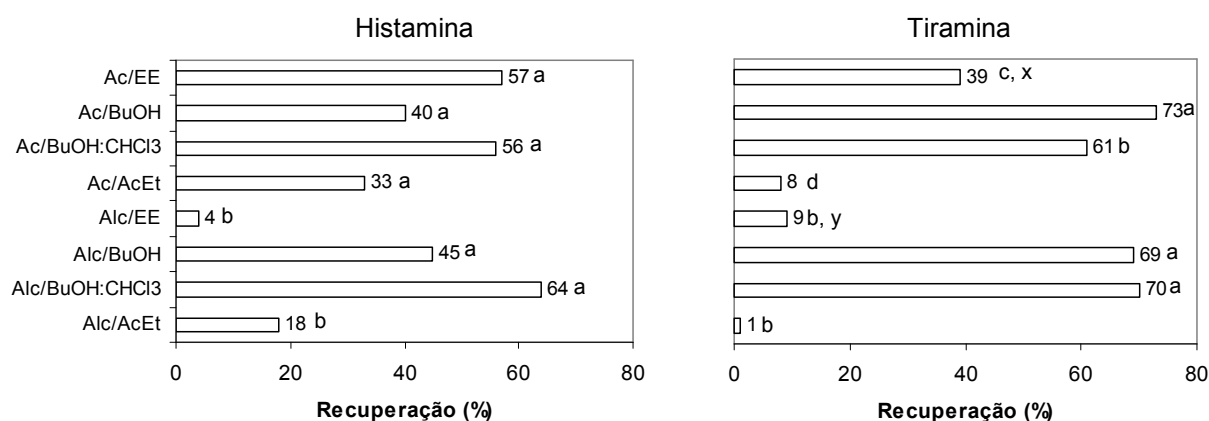


Figura IV.1: Eficiência da extração líquido-líquido de histamina e tiramina em extratos ácido e alcalino com quatro diferentes solventes orgânicos. Extrato ácido purificado com éter etílico (Ac/EE); *n*-butanol (Ac/BuOH); *n*-butanol:clorofórmio (Ac/BuOH:CHCl₃); acetato de etila (Ac/AcEt). Extrato alcalino purificado com éter etílico (Alc/EE); *n*-butanol (Alc/BuOH); *n*-butanol:clorofórmio (Alc/BuOH:CHCl₃); acetato de etila (Alc/AcEt).

Valores com letras diferentes (a-d) apresentaram diferença significativa entre os solventes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$). Valores com letras diferentes (x-y) apresentaram diferença significativa entre os extratos ácido e alcalino (Análise de variância, $p \leq 0,05$).

Tabela IV.1: Recuperação das aminas bioativas interferentes na determinação de histamina e tiramina de extratos ácido e alcalino de queijo parmesão ralado após extração líquido-líquido com quatro solventes orgânicos

Aminas Bioativas	% média de recuperação de aminas bioativas (%CV) / Solvente / Extrato							
	Éter etílico		<i>n</i> -Butanol		<i>n</i> -Butanol-CHCl ₃		Acetato de etila	
	Ácido	Alcalino	Ácido	Alcalino	Ácido	Alcalino	Ácido	Alcalino
Espermina	54,0 a,x (14)	4,2 c,y (27)	48,2 a,x (25)	31,6 b,y (64)	49,8 a (11)	49,6 a (13)	14,2 b (7)	0,0 c
Espermidina	38,9 ab,x (51)	10,3 ab,y (30)	60,9 a,x (51)	31,6 a,y (47)	20,1 bc (19)	0,7 b (28)	6,7 c (40)	1,1 b (11)
Agmatina	6,8 a,x (18)	0,0 y	2,6 b,x (26)	0,0 y	3,3 b,x (17)	0,0 y	2,6 b,x (23)	0,0 y
Putrescina	46,4 a (40)	34,3 b (27)	63,3 a (41)	72,2 a (11)	51,4 a (25)	65,5 a (6)	0,9 b (60)	0,0 c
Cadaverina	56,8 b,x (24)	18,2 b,y (27)	75,9 a (27)	71,4 a (12)	63,5 ab (9)	73,7 a (5)	1,9 c (69)	0,0 c
Feniletilamina	71,3 a,x (4)	17,4 c,y (30)	30,9 c (12)	33,4 b (9)	61,0 b,y (5)	68,7 a,x (1)	35,3 c (9)	35,4 b (15)
Triptamina	25,0 b (19)	4,1 c (23)	20,6 b (32)	24,1 b (12)	61,7 a (9)	85,9 a (22)	28,4 b (4)	15,3 bc (21)

CV: coeficiente de variação; CHCl₃: clorofórmio. Valores para cada linha com letras diferentes (a-c) apresentaram diferença significativa entre os solventes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$). Valores com letras diferentes (x-y) apresentaram diferença significativa entre os extratos ácido e alcalino (Análise de variância, $p \leq 0,05$).

Não foi possível verificar a interferência do tipo do extrato na extração da serotonina, pois esta indolamina não foi detectada nas amostras de queijo analisadas. Para um estudo mais conclusivo, é necessário utilizar o método de adição de padrão para verificar a recuperação desta amina.

A recuperação de aminas purificadas por extração líquido-líquido com solventes orgânicos de extratos obtidos com diferentes ácidos e com metanol foi investigado por TAYLOR et al. (1978) e VALE & GLÓRIA (1997). Entretanto, a comparação da purificação utilizando extratos ácido e alcalino de queijo foi descrito pela primeira vez no presente trabalho. A extração alcalina foi mais eficiente na extração de aminas. Além disso, quando a etapa de purificação é necessária, o extrato final já está no pH alcalino requerido para a partição de aminas para uma fase orgânica.

3.2 INFLUÊNCIA DO pH NA EFICIÊNCIA DA PURIFICAÇÃO DE AMINAS POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Baseado no fato de que o pH do extrato pode afetar o equilíbrio de partição das aminas entre as fases aquosa e orgânica, o pH do extrato alcalino de queijo ralado (fase aquosa), que variou de 9,23 a 9,57, foi ajustado para 9,0; 10,0 e 13,0. Os dois primeiros estavam próximos ao valor do pK_a dos grupos amino primário da tiramina e histamina (9,74 e 9,75, respectivamente) e o último foi o pH utilizado por vários pesquisadores (VALE & GLÓRIA, 1997; LANGE et al., 2002).

Os resultados estatísticos da purificação das aminas pelos quatro solventes em diferentes valores de pH estão apresentados no Apêndice A. Houve um efeito significativo do pH do meio no comportamento de histamina e tiramina purificadas por extração líquido-líquido com três dos quatro diferentes solventes (figura IV.2). Estes resultados indicam que é essencial um controle rigoroso do pH na etapa de purificação de aminas por extração líquido-líquido. Entretanto, quando clorofórmio foi utilizado, não foi observado efeito significativo do pH na extração de histamina e tiramina, provavelmente porque elas foram muito pouco extraídas.

Quando considerados os diferentes solventes testados, a extração com *n*-butanol em pH 10,0 extraiu tiramina com alta recuperação (123%), mas não histamina (64%). Ele foi também capaz de extrair outras aminas, entre elas, cadaverina, agmatina e serotonina. Inclusive, este método de purificação foi utilizado por CHANG et al. (1985) para extrair cinco aminas com recuperações acima de 76%.

A purificação com acetato de etila apresentou baixas porcentagens de recuperação de histamina (58%) e menor ainda para tiramina (12%). Este método foi descrito por ULLA et al. (1989) para a purificação de tiramina de vinho. Boas recuperações foram relatadas, mas nenhum detalhe foi fornecido em relação ao pH utilizado. Resultados contraditórios a este estudo foram relatados por SEN (1969) e JALON et al. (1983), que encontraram recuperações de 84 a 94% para tiramina em pH 10,4.

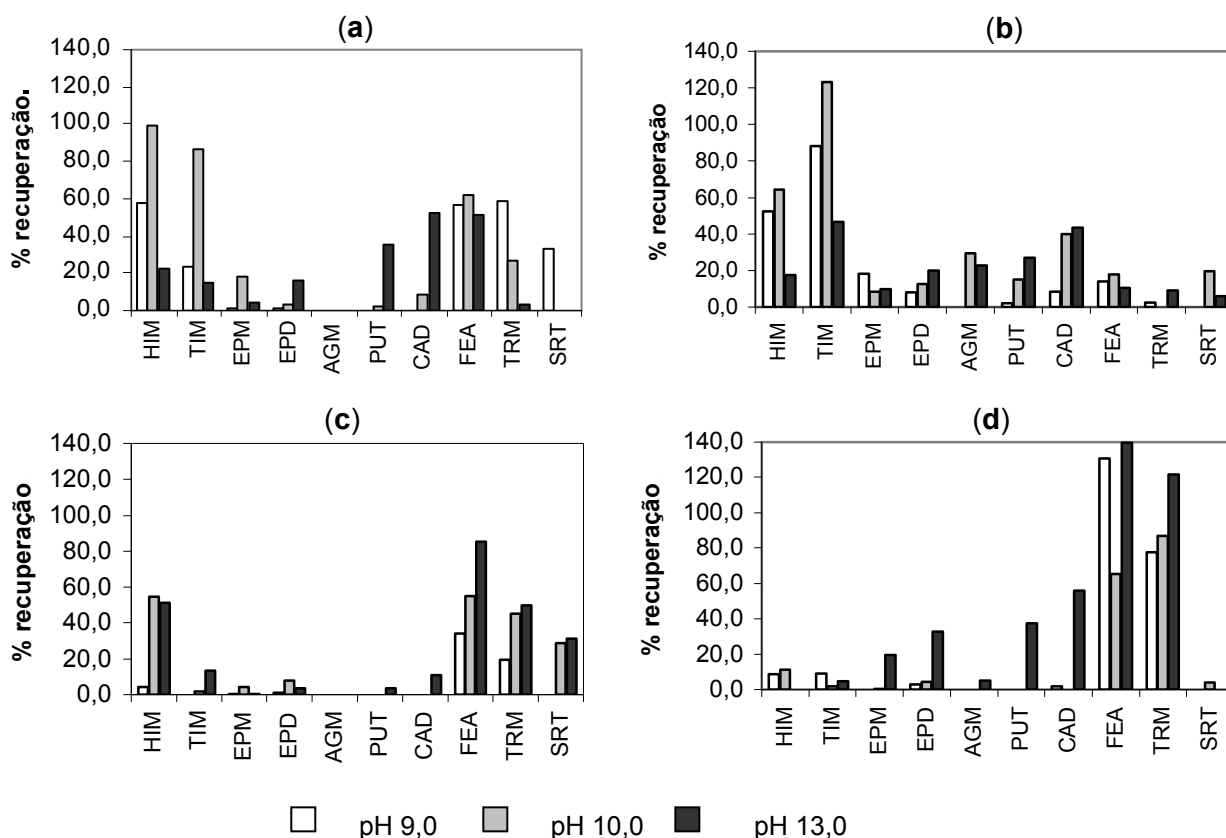


Figura IV.2: Variação dos valores médios de recuperação das aminas bioativas em função do pH do extrato na extração líquido-líquido com (a) éter etílico; (b) *n*-butanol; (c) acetato de etila; e (d) clorofórmio. HIM: histamina; TIM: tiramina; EPM: espermina; EPD: espermidina; AGM: agmatina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEA: feniletilamina; TRM: triptamina; SRT: serotonina.

Durante a purificação com clorofórmio, as aminas melhor recuperadas foram feniletilamina (112%), triptamina (95%) e cadaverina (56%). A recuperação da histamina foi inexpressiva, apesar desta ser solúvel em clorofórmio (LIDE, 1995). TAYLOR et al. (1978) observaram menores coeficientes de partição para esta amina em clorofórmio comparado ao *n*-butanol, sugerindo que vários fatores além da solubilidade afetam esta etapa de purificação.

Entre os valores de pH testados para os solventes, a extração com éter etílico em pH 10 apresentou as melhores recuperações para histamina e tiramina (87 – 100%). As recuperações estão de acordo com o critério estabelecido pelo *CODEX ALIMENTARIUS* (1993). Entretanto, éter etílico em pH 10 foi eficiente também na extração das aminas que podem interferir na determinação de histamina e tiramina, entre elas, feniletilamina, triptamina e em menor extensão, espermina.

3.3 COMPARAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM ÉTER ETÍLICO SEM E COM SUPORTE SÓLIDO

Os percentuais de recuperação de histamina e tiramina após purificação por extração líquido-líquido com éter etílico associado ao uso do suporte sólido estão indicados na tabela IV.2. Diferenças significativas foram observadas nos resultados com recuperações muito baixas quando Extrelut® foi utilizado. Resultados semelhantes foram observados para as outras aminas biogênicas detectadas no queijo ralado.

Tabela IV.2: Recuperação de aminas bioativas após purificação por extração com éter etílico pelo método clássico, em valores de pH 10,0 e 9,0 e pelo método de adsorção em suporte sólido – terra diatomácea em pH 9,4

Aminas bioativas	% Recuperação / método		
	Éter etílico		Suporte sólido
	pH 10,0	pH 9,0	pH 9,4
Histamina	99,9 a	57,7 b	21,2 c
Tiramina	86,5 a	23,1 b	26,0 b
Espermina	18,5 a	1,2 b	nd b
Espermidina	3,2 a	1,5 b	0,7 b
Agmatina	0,0	0,0	0,0
Putrescina	1,7	0,0	5,2
Cadaverina	8,4	0,0	21,6
Feniletilamina	62,0 a	56,7 a	0,2 b
Triptamina	26,7 b	58,7 a	0,0 c
Serotonina	0,0 b	32,7 a	0,0 b

Valores médios para cada linha com letras diferentes apresentaram diferença significativa entre os métodos (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$).

Estes resultados são contraditórios ao reportado por BILIC (1996), que encontrou percentuais de recuperação acima de 79% para histamina, tiramina, cadaverina, feniletilamina e triptamina de meio de cultura por extração com *n*-butanol após adsorção da amostra em Extrelut®. A recuperação das aminas purificadas por extração sólido-líquido pode ser influenciada pelo solvente orgânico utilizado, visto que, o mesmo autor encontrou recuperações mais baixas para todas as aminas com outros solventes.

4 CONCLUSÕES

A purificação de histamina e tiramina por extração líquido-líquido foi estudada comparativamente pela primeira vez. A purificação destas aminas, bem como outras aminas bioativas por extração líquido-líquido foi afetada significativamente pelo tipo de solvente utilizado para extrair as aminas do extrato de queijo, pelo pH do meio e também pelo uso de suporte sólido. O uso de um suporte sólido durante purificação com éter etílico diminuiu significativamente a recuperação das aminas. A extração alcalina de aminas de queijo seguida pela purificação com éter etílico em pH 10 permitiu recuperação adequada de histamina e tiramina. Entretanto este procedimento não foi seletivo para histamina e tiramina.

CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE AMINAS BIOATIVAS E AMINOÁCIDOS

RESUMO

A purificação de aminas bioativas de extrato bruto de queijos pode ser realizada por extração em fase sólida, utilizando-se cartuchos C₁₈ ou troca iônica. Este trabalho teve como objetivo investigar a eficiência e os fatores que influenciam a purificação em fase sólida de histamina e tiramina de extratos de queijo parmesão ralado, utilizando cartuchos SEP-PAK C₁₈, troca aniônica e catiônica. A purificação com SEP-PAK C₁₈ não foi seletiva e não apresentou percentuais de recuperação adequados para histamina e tiramina. Na purificação com bentonite, observou-se que o tempo de agitação e a concentração desta afetou significativamente os resultados de retenção da histamina e demais aminas interferentes. Tiramina não ficou retida em bentonite em nenhuma condição testada. Na purificação por troca aniônica não foi observada variação na eluição da maioria das aminas bioativas com diferentes volumes de água de lavagem, tamanhos da malha da resina, e números de ligações cruzadas da matriz da resina. As aminas fenólicas (tiramina e serotonina) ficaram retidas na resina de troca aniônica e não foram eluídas eficientemente pelos solventes testados. As demais aminas foram eluídas sem a presença de aminoácidos. As aminas bioativas ficaram retidas fortemente na resina de troca catiônica testada, sendo necessária elevada força iônica para eluição destas. No entanto, o aumento da força iônica não permitiu eluição seletiva das aminas. Nenhuma das condições testadas foi capaz de obter histamina e tiramina sem a presença dos interferentes. A troca aniônica foi eficaz na remoção dos aminoácidos, permitindo a eluição das aminas bioativas, exceto serotonina e tiramina.

Palavras-chave: Extração em fase sólida, aminas bioativas, troca iônica, bentonite.

1 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo investigar a eficácia e os fatores que influenciam a purificação de histamina e tiramina em fase sólida e a capacidade de eliminar a interferência de oito aminas bioativas e aminoácidos de extratos de queijo parmesão ralado. Os objetivos específicos foram (i) avaliar a influência de cartuchos SEP-PAK C₁₈ na purificação de extrato de queijo parmesão ralado; (ii) otimizar as condições de purificação de histamina e tiramina com bentonite; (iii) avaliar a retenção de histamina, tiramina, oito aminas bioativas e aminoácidos interferentes em resina de troca aniônica por método oficial da AOAC para histamina em pescado; (iv) avaliar a influência do tamanho da malha da resina e do número de ligações entre os grupos de poliestireno da resina de troca aniônica na retenção de histamina, tiramina e oito aminas interferentes; (v) avaliar a eluição de tiramina da resina de troca aniônica; (vi) avaliar a retenção e eluição de histamina, tiramina e oito aminas interferentes em resina de troca catiônica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

As amostras de queijo parmesão ralado foram adquiridas, no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. A amostra indenticada no capítulo I com menor teor de histamina e tiramina foi selecionada para o estudo do efeito dos procedimentos de extração na recuperação de aminas. Para obtenção de um *pool* de 500 g, foram agrupados e homogeneizadas várias embalagens da mesma marca e lote de queijo parmesão ralado. Amostras sem adição de padrão foram utilizadas como matriz em alguns experimentos, enquanto amostras adicionadas de duas concentrações (5,0 e 10,0 mg/100 g) de solução padrão contendo dez aminas foram utilizadas em outros. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.1.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto os solventes utilizados na CLAE (acetonitrila e metanol), que foram de grau cromatográfico. Toda a água utilizada foi ultrapura obtida pelo Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Os padrões das aminas bioativas histamina (HIM, dicloridrato), tiramina (TIM, cloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), espermidina (EPD, tricloridrato), agmatina (AGM, complexo sulfato creatinina), putrescina (PUT, dicloridrato), cadaverina (CAD, dicloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato), triptamina (TRM) e 5-hidroxitriptamina (serotonina – SRT, cloridrato) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). *orto*-Ftalaldeído também foi adquirido da Sigma.

A purificação em fase sólida foi testada em cartuchos SEP-PAK® C₁₈ (Waters, Millipore Corporation, Milford, MA, EUA); resinas de troca aniônica Dowex1 - X8 e Dowex1- X2 (Dow Chemical, EUA); cartuchos de troca iônica IC-Chelate, IC-H e IC-Na (Alltech, Deerfield, IL, EUA); e resina de troca catiônica AG® 50W - X8 (BioRad, EUA).

2.1.3 Preparo da solução padrão de aminas

As aminas foram pesadas considerando-se o peso da base livre e foram dissolvidas em ácido clorídrico 0,1 mol/L, obtendo-se soluções individuais de 1,0 mg de cada amina/mL. Um mililitro de cada amina foi transferido para um balão volumétrico de 10,00 mL para preparo da solução contendo 0,1 mg/mL de cada amina.

As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição com HCl 0,1 mol/L de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 10,0 mL da solução com as dez aminas em balão volumétrico de 100,00 mL, obtendo-se as concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 10,0 µg/mL. Estas soluções foram utilizadas para o preparo da curva padrão externa que foi utilizada para quantificar as aminas.

As soluções de 100,0 µg/mL e 50,0 µg/mL com as dez aminas foram preparadas transferindo-se 1,0 mL e 0,5 mL, respectivamente, da solução 1,0 mg/mL de cada uma das aminas para um balão volumétrico de 10,00 mL. Estas soluções foram utilizadas nos estudos de recuperação de aminas com adição de padrão. As soluções foram armazenadas em frascos de polietileno a 4 ± 1 °C.

2.1.4 Obtenção dos extratos de queijo parmesão ralado

As aminas foram extraídas das amostras de queijo ralado utilizando-se ácido clorídrico (HCl) 1,0 mol/L, metanol e etanol, de acordo com os procedimentos otimizados no capítulo II.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Eficiência do SEP-PAK C₁₈ na purificação de extratos ácido e etanólico de queijo parmesão ralado

Os extratos ácido (HCl 1,0 mol/L) e etanólico com adição de soluções padrão contendo diferentes concentrações de aminas (5,0 e 10,0 mg/100 g) foram utilizados neste estudo. A purificação dos extratos em cartuchos SEP-PAK C₁₈ foi feita segundo procedimento descrito por TAVARES-NETO et al. (2003). Os cartuchos foram ativados com 5,0 mL de acetonitrila. Foram passados pela coluna 5,0 mL dos extratos e em seguida, foram passados 10,0 mL de água para o extrato ácido e 10,0 mL de etanol para o extrato etanólico. Após eluição os cartuchos foram regenerados com acetonitrila. O experimento foi realizado em triplicata.

Os extratos etanólico e ácido adicionados ou não de padrão na etapa de extração foram analisados por CLAE com par iônico antes e após a purificação com SEP-PAK C₁₈. O percentual de recuperação foi obtido pela diferença entre a concentração de cada amina na matriz antes e após a purificação.

2.2.2 Purificação de extrato de queijo parmesão ralado com bentonite

2.2.2.1 Otimização da purificação de histamina e tiramina de extrato de queijo parmesão ralado com bentonite

a) Influência da massa de bentonite utilizada

Foram testadas quatro concentrações de bentonite: 1,0; 10,0; 50,0 e 100,0 mg/mL de extrato ácido (HCl 1,0 mol/L) de queijo parmesão ralado obtido sem e com adição de 5,0 e 10,0 mg/100 g de padrão. As misturas foram agitadas por 1 h em mesa agitadora, centrifugadas a 3354 g a temperatura ambiente por 5 min e filtradas em papel de filtro qualitativo.

b) Influência do tempo de agitação

Foram testadas as condições sem agitação e três tempos de agitação (15, 30 e 60 min) para extratos adicionados de 50,0 mg de bentonite por mL de extrato ácido de queijo parmesão ralado (HCl 1,0 mol/L) obtido sem e com adição de 10,0 mg/100 g de padrão. A mistura sem agitação foi mantida em repouso por 12 h e as outras amostras foram agitadas em mesa agitadora orbital a 250 rpm. Todas as misturas foram centrifugadas a 3354 g a temperatura ambiente por 5 min e filtradas em papel de filtro qualitativo.

2.2.3 Purificação de aminas bioativas por troca aniônica

2.2.3.1 Perfil de eluição e retenção das aminas bioativas e aminoácidos

A interação das aminas bioativas e aminoácidos em resina de troca aniônica Dowex1 - X8, 100 mesh foi investigada, utilizando-se o procedimento descrito por AOAC (1995) para análise de histamina em pescado. O contra-íon da resina foi convertido para hidroxila com NaOH 2,0 mol/L e lavagem com água ultrapura. Esta foi acondicionada em coluna de 20,0 x 0,7 cm com lã de vidro na base até a altura de 8,0 cm e o fluxo foi mantido a 3,0 mL/min, utilizando-se bomba peristáltica (TECNAL, Piracicaba, SP).

Foi pipetado 1,00 mL de solução padrão de dez aminas na concentração de 50,0 µg/mL cada na coluna e 5,0 mL de água ultrapura, coletando o eluato em balão volumétrico de 50,00 mL contendo 5,0 mL de HCl 1,0 mol/L. Foi adicionado água ultrapura até aproximadamente 35 mL terem sido eluídos. O volume do balão volumétrico foi completado e a solução homogeneizada. Este teste foi realizado em triplicata. A regeneração da resina foi feita em béquer de acordo com o procedimento descrito por AOAC (1995) e toda a água utilizada na troca iônica foi ultrapura.

Estes procedimentos foram repetidos adicionando diferentes volumes da solução padrão das dez aminas, obtendo concentrações finais de 0,6, 1,0 e 2,0 µg/mL. Também foi avaliada a retenção de três aminoácidos (histidina, tirosina e fenilalanina), na presença das dez aminas, adicionando-se 1,00 mL de uma mistura dos três aminoácidos e das dez aminas na concentração de 100,0 µg/mL cada.

Como controle, foi preparada uma solução contendo 1,0 mL de solução de aminoácidos 100,0 µg/mL e 1,00 mL de solução de aminas 100,0 µg/mL (sem passar na resina) em balão volumétrico de 50,00 mL contendo 5,0 mL de HCl 1,0 mol/L e o volume foi completado com água ultrapura. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Foi avaliada a purificação do extrato metanólico de queijo ralado seguindo o mesmo procedimento descrito. Foi pipetado 1,00 mL do extrato de queijo parmesão ralado (2,0000 g de amostra/50,00 mL) na coluna e 5,0 mL de água, coletando o eluato em balão volumétrico de 50,00 mL contendo 5,0 mL de HCl 1,0 mol/L. Foi adicionado água até aproximadamente 35 mL terem sido eluídos. O volume do balão volumétrico foi completado e a solução foi homogeneizada. Foi testado também o extrato adicionado de solução padrão de aminas (44,0 µg de amina/mL do extrato) e aminoácidos (50,0 µg do aminoácido/mL do extrato). Para comparação, as amostras foram diluídas na mesma proporção sem passar na resina.

2.2.3.2 Influência do volume de água de lavagem na eluição das aminas bioativas

Para avaliar a lavagem da resina após a adição da amostra, foi pipetado 1,0 mL de solução de aminoácidos 100 µg/mL e 1,00 mL de solução de dez aminas 100,0 µg/mL na coluna e 5,0 mL de água, coletando o eluato em balão volumétrico de 25,00 mL contendo 5,0 mL de HCl 1,0 mol/L. Foi adicionado água até aproximadamente 20 mL terem sido eluídos. Foi completado o volume do balão volumétrico e a solução foi homogeneizada. Este teste foi realizado em seis repetições e os valores foram comparados com os resultados obtidos com a lavagem com aproximadamente 30 mL de água, coletada em balão volumétrico de 50,00 mL (AOAC, 1995).

2.2.3.3 Influência do tamanho da malha da resina e o número de ligações entre os grupos de poliestireno na eluição das aminas bioativas

Foi avaliada a purificação das aminas e aminoácidos nas resinas Dowex1 - X8, 50 e 100 mesh e Dowex1 - X2, 100 mesh. Foi pipetado 1,00 mL de solução de aminoácidos 100,0 µg/mL e 1,00 mL de solução de aminas 100,0 µg/mL na coluna e 5,0 mL de água, coletando o eluato em balão volumétrico de 25,00 mL contendo 5,0 mL de HCl 1,0 mol/L. Foi adicionado água até aproximadamente 20 mL terem sido eluídos. Foi completado o volume do balão volumétrico e a solução foi homogeneizada. Este teste foi realizado em triplicata em cada resina acima citada.

A influência do tipo de resina também foi avaliada na retenção de aminas em extrato metanólico de queijo parmesão ralado. Foi pipetado 2,00 mL da amostra (extrato metanólico 10,0 g/100 mL) na coluna e 5,0 mL de água, coletando o eluato em balão volumétrico de 25,00 mL contendo 5,0 mL de HCl 1,0 mol/L. Foi adicionado água até aproximadamente 20 mL terem sido eluídos. Foi completado o volume do balão volumétrico e a solução foi homogeneizada. Este teste foi realizado em triplicata em cada

resina acima citada. As amostras foram diluídas na mesma proporção sem passar na resina para comparação.

2.2.3.4 Eluição da histamina, da tiramina, dos aminoácidos e de oito aminas

Após adição de 1,00 mL de solução de aminoácidos (100,0 µg/mL) e 1,00 mL de solução de aminas (100,0 µg/mL) na resina Dowex1 - X8 100 mesh e lavagem com água, foi testada a eluição dos aminoácidos e aminas com NaOH 0,1 mol/L, NaOH 2,0 mol/L e HCl 0,1 mol/L separadamente. Cada eluato foi coletado em balão volumétrico de 25,00 mL.

Foi avaliada a eluição das aminas e aminoácidos com tampão fosfato em pH 5,5 após adição na resina Dowex1 - X8, 100 mesh de 1,00 mL do extrato etanólico sem e com adição de solução padrão de aminas para obter uma concentração de 5,0 mg/100 g e lavagem com água ultrapura. Cada eluato foi coletado em balão volumétrico de 50,00 mL.

2.2.4 Purificação de aminas bioativas por troca catiônica

2.2.4.1 Purificação de aminas em cartuchos de troca iônica

Foi realizada a purificação de aminas bioativas em cartuchos comerciais de troca iônica IC-Chelate, IC-H e IC-Na. Foi utilizado o mesmo procedimento para os três tipos de cartuchos. Os cartuchos foram acondicionados com 10,0 mL de água ultrapura e em seguida, 5,00 mL da solução padrão de 10,0 µg/mL de cada amina foram eluídos. Os cartuchos foram lavados com 5,0 mL de água ultrapura, 5,0 mL de HCl 0,1 mol/L e mais 5,0 mL de água ultrapura.

Foi comparada a retenção de aminas nos cartuchos comerciais e na resina de troca catiônica com grupo sulfônico AG® 50W - X8, 50 mesh; forma H⁺. A resina foi seca em estufa à 60 °C por 12 h, resfriada em dessecador por 30 min e pesada. Foram adicionados 20,0 mL de água à resina e esta foi mantida em repouso por 1 h. A resina foi tratada com HCl 1,0 mol/L e água ultrapura (van HAASTER et al., 1993).

A resina devidamente tratada foi acondicionada em coluna de polietileno 6,0 x 1,4 cm com lã de vidro na base até a altura de 1,0 cm, mantendo um fluxo de 3,0 mL/min por meio de bomba peristáltica. Foram adicionados na coluna 2,00 mL de extrato etanólico ou ácido de queijo parmesão ralado sem e com adição de solução padrão de aminas de forma a se obter adição de 5,0 e 10,0 mg/100 g. Foi adicionado em seguida 5,0 mL de

água ultrapura, coletando o eluato em balão volumétrico de 50,00 mL contendo 5,0 mL de HCl 1,0 mol/L. Foi adicionada água ultrapura até aproximadamente 35 mL terem sido eluídos. O volume do balão volumétrico foi completado e a solução foi homogeneizada.

2.2.4.2 Teste preliminar de separação da tiramina e da histamina

A resina AG® 50W - X8, 50 mesh; forma H⁺ tratada como citado no item anterior foi acondicionada em coluna de 20,0 x 0,7 cm com lã de vidro na base até a altura de 8,0 cm. O teste preliminar foi realizado com uma alíquota de 1,00 mL da solução padrão de histamina e tiramina 0,5 mg/mL cada. A alíquota foi adicionada à coluna, seguida de 20,0 mL de solução tampão fosfato em pH 5,6 (11,6 mL de solução Na₂HPO₄ 0,2 mol/L e 8,4 mL de solução de ácido cítrico 0,1 mol/L) para lavagem da coluna, em fluxo de 1,0 mL/min. Foram passados pela coluna em seqüência 15,0 mL de solução NaCl 3,0 mol/L tamponada em pH 5,6; 15,0 mL de solução tampão fosfato em pH 6,6; 15,0 mL de solução NaCl 3,0 mol/L tamponada em pH 6,6, 15,0 mL de solução tampão borato em pH 8,0 (50,0 mL de solução H₃BO₃ 0,1 mol/L e 4,0 mL de NaOH 0,1 mol/L, completando o volume para 100,00 mL) e foi feita a lavagem da resina com NaOH 0,1 mol/L. Os eluatos foram coletados em frações e analisados por CLAE com par iônico.

Foi analisada outra seqüência de eluentes. Para isto foi utilizada uma alíquota de 100,0 µL, que corresponde a 5% do volume da coluna, da solução padrão de tiramina e histamina 0,5 mg/mL. Esta foi adicionada à coluna, seguida de 25,0 mL de solução tampão fosfato em pH 5,6, em fluxo de 1,0 mL/min. Foram testados como eluentes em seqüência 25,0 mL de solução tamponada em pH 5,6 contendo NaCl e KCl 0,35 mol/L cada, 25,0 mL da solução anterior com 30% de isopropanol (STANDARA et al., 2000) e 50,0 mL de solução de NaCl e KCl 1,0 mol/L cada tamponada em pH 5,6.

2.2.4.3 Perfil de separação da histamina e tiramina na presença de oito aminas bioativas e aminoácidos

Foi utilizada a resina AG® 50W - X8, 50 mesh; forma H⁺ tratada e acondicionada em coluna de 20,0 x 0,7 cm com lã de vidro na base até a altura de 8,0 cm. Foram avaliadas algumas soluções eluentes preliminarmente. Para isto, uma alíquota de 2,00 mL da solução padrão 100,0 µg/mL das dez aminas (putrescina, cadaverina, tiramina, histamina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina, feniletilamina e triptamina) foi adicionada à coluna preparada como no item anterior mantendo o fluxo de 1,0 mL/min. Foram adicionados 50,0 mL de solução tampão fosfato em pH 5,6; 50,0 mL de solução de NaCl 0,5 mol/L e 45,0 mL de solução de NaCl 1,0 mol/L, ambas tamponadas em pH 5,6.

Foi avaliado também o perfil das aminas na mesma condição citada acima após adição de 25,0 mL de solução tampão fosfato em pH 5,6 e eluição com 200,0 mL de solução de NaCl 0,5 mol/L e KCl 0,5 mol/L tamponada em pH 5,6 (STANDARA et al., 2000). Após a eluição das aminas, a resina foi recuperada com 25,0 mL de solução de NaOH 1,0 mol/L, seguidos de 25,0 mL de água, 25,0 mL de HCl 1,0 mol/L e 25,0 mL de água.

Foi avaliado o perfil de eluição das aminas bioativas e de aminoácidos com soluções tampão de acetato pH 5,2 sem e com a adição de 20% de metanol; tampão de fosfato pH 7,0; HCl 1,0 mol/L; NaCl 2,0 mol/L em pH 5,2; NaCl 3,0 mol/L em pH 7,0 e 8,0. Para isto foi utilizada a resina AG® 50W - X8 tratada e acondicionada em coluna de 20,0 x 0,7 cm até a altura de 8,0 cm. Foi pipetado 1,00 mL de solução padrão de dez aminas e três aminoácidos (histidina, tirosina e fenilalanina) na concentração de 100,0 µg/mL cada, na coluna, e 5,0 mL do eluente, coletando o eluato em balão volumétrico de 50,00 mL. Foi adicionado o eluente até aproximadamente 35 mL terem sido eluídos. O volume do balão volumétrico foi completado e a solução foi homogeneizada. Este teste foi realizado em triplicata e toda a água utilizada na troca iônica e no preparo das soluções foi ultrapura.

A eluição das aminas e aminoácidos com tampão acetato em pH 5,5 foi avaliada seguindo o procedimento descrito acima a partir de 2,00 mL do extrato etanólico de queijo parmesão ralado. A eluição com tampão fosfato pH 7,0; NaCl 2,0 mol/L em pH 5,2 adicionado de 20% de metanol e acetronitrila (1:1); NaCl 3,0 mol/L em pH 7,0 e 8,0 foi avaliada a partir de 2,00 mL do extrato ácido de queijo parmesão ralado.

Para comparação, foi diluído 1,00 mL de solução de aminas e aminoácidos 100,0 µg/mL sem passar na resina em um balão volumétrico de 50,00 mL com cada eluente utilizado. Os extratos alcoólico e ácido também foram diluídos na mesma proporção utilizada na análise, sem passar na resina.

2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE

2.3.1 Separação e determinação de aminas bioativas por CLAE

Para avaliação da seletividade e da recuperação das aminas estudadas, todos os eluatos foram analisados por CLAE com par iônico. As amostras foram filtradas em membranas (13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro) tipo HAWP para solvente aquoso e HVWP para solvente orgânico (Millipore Corp. Milford, MA, EUA). As aminas foram separadas por CLAE com par iônico e quantificadas fluorometricamente a

340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente, após derivação pós-coluna com o-ftalaldeído, conforme descrito no capítulo I.

2.3.2 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PURIFICAÇÃO DE HISTAMINA, TIRAMINA E OITO AMINAS BIOATIVAS COM SEP-PAK C₁₈

Conforme apresentado na tabela V.1, a purificação por SEP-PAK C₁₈ de extratos de queijo adicionado de dois níveis de padrão de aminos foi afetada pelo tipo de extrato e concentração de aminos.

Histamina apresentou boa recuperação no extrato ácido adicionado com 5,0 mg/100 g de padrão, comparado ao extrato etanólico. Isto era esperado, visto que no extrato ácido, a amina está ionizada, apresentando então menor afinidade pelo material apolar do SEP-PAK C₁₈. Por outro lado, tiramina apresentou baixos valores de recuperação em ambos extratos.

As aminos aromáticas feniletilamina, triptamina e serotonina apresentaram baixas ou nenhuma recuperação. No entanto, as aminos mais polares, como espermina, espermidina e agmatina, inclusive no extrato ácido, também apresentaram alguma retenção, que pode ser devido a uma baixa cobertura da resina no material de base que é polar - sílica (COLLINS et al., 1997). KIM et al. (1995), utilizando cartuchos de SEP-PAK C₁₈ para purificação de aminoácidos livres de coníferas, também observaram retenção de um composto polar, a metionina, com recuperação de apenas 33%.

Desta forma, o SEP-PAK C₁₈ não foi um bom meio de purificação de histamina e tiramina.

Tabela V.1: Recuperação da histamina, tiramina e oito aminas bioativas após purificação dos extratos ácido e etanólico de queijo parmesão ralado com SEP-PAK C₁₈

	% Recuperação (% CV) / Extrato / Nível de adição de padrão			
	Extrato ácido		Extrato etanólico	
	5,0 mg/100 g	10,0 mg/100 g	5,0 mg/100 g	10,0 mg/100 g
Histamina	108,0 a (26)	65,2 (66)	57,0 b (13)	62,2 (8)
Tiramina	51,3 (18)	41,4 (31)	40,7 (27)	53,2 (9)
Espermina	14,4 b,y (52)	83,7 a,x (11)	73,2 a (10)	56,8 b (64)
Espermidina	89,7 a (1)	88,3 a (6)	46,3 b (32)	45,5 b (6)
Agmatina	25,7 y (9)	52,0 b,x (13)	13,5 y (97)	77,9 a,x (5)
Putrescina	92,6 a,x (14)	65,3 y (15)	72,7 b (5)	81,1 (6)
Cadaverina	75,2 x (16)	44,1 b,y (6)	78,0 y (3)	87,1 a,x (7)
Feniletilamina	0,0	0,0	0,0	0,0
Triptamina	0,0	0,0 b	0,0 y	30,0 a,x (3)
Serotonina	19,6 b,x (8)	12,8 b,y (14)	45,7 a,y (6)	68,1 a,x (7)

CV: coeficiente de variação; 5,0 e 10,0 mg/100 g são as concentrações de cada amina adicionada à amostra. Valores para cada linha com letras diferentes (a-b) apresentam diferença significativa entre os extratos (Análise de variância, $p \leq 0,05$). Valores com letras diferentes (x-y) apresentaram diferença significativa entre as concentrações de adição de padrão. Valores sem indicação de letras não apresentaram diferença significativa (Análise de variância, $p \geq 0,05$).

3.2 PURIFICAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA COM BENTONITE

3.2.1 Estudo da influência da proporção de bentonite utilizada

Os resultados obtidos no estudo sobre a influência da quantidade de bentonite na retenção de aminas bioativas em extratos adicionados de diferentes concentrações de solução de aminas estão apresentados na tabela V.2.

O objetivo desta etapa foi determinar a quantidade de bentonite necessária para obter maior retenção das aminas nos trocadores catiônicos deste composto. Histamina ficou mais de 70% retida em 10,0; 50,0 e 100,0 mg de bentonite por mililitro de extrato, no entanto a reprodutibilidade foi muito baixa, com CV de mais de 80%. Tiramina por outro lado não apresentou retenção e nem diferença significativa entre as condições. Com 1,0 mg de bentonite por mililitro de extrato, apenas espermina e agmatina apresentaram recuperações baixas. Com 10,0 mg/mL de bentonite, observou-se retenção significativa de espermina, espermidina, agmatina, triptamina e serotonina. Com 50,0 mg/mL de

bentonite, além das aminos retidas na concentração inferior, observou-se retenção de aproximadamente 50% de putrescina, cadaverina e feniletilamina. No entanto, com 100,0 mg/mL de bentonite, putrescina e cadaverina apresentaram recuperações maiores comparadas a 50,0 mg/L.

De um maneira geral, a concentração de bentonite 50,0 mg/mL foi a que apresentou os menores valores de recuperação para a maioria das aminos. Resultados mais completos estão disponíveis no Apêndice B.

Tabela V.2: Influência da concentração de bentonite, mantida em contato por 60 min, na recuperação média de histamina, tiramina e oito aminos interferentes purificadas de extrato ácido de queijo parmesão ralado, adicionado de padrão em dois níveis de concentração (5,0 e 10,0 mg/100 g)

Aminas bioativas	% de recuperação (% CV) / bentonite (mg/mL de extrato)			
	1,0	10,0	50,0	100,0
Histamina	97,8 a (110)	20,5 b (88)	21,5 b (81)	35,8 b (40)
Tiramina	138,4 (31)	126,7 (52)	97,6 (52)	132,0 (38)
Espermina	0,0	0,0	0,0	0,0
Espermidina	89,4 a (22)	11,2 b (28)	0,6 c (124)	0,8 c (89)
Agmatina	19,8 a (107)	0,0 c	0,0 c	13,5 b (34)
Putrescina	187,9 a (3)	101,5 b (59)	54,3 c (48)	94,3 b (27)
Cadaverina	139,4 a (60)	100,1 b (96)	57,9 c (63)	103,9 b (31)
Feniletilamina	119,2 a (13)	104,4 b (15)	60,8 c (31)	67,7 c (16)
Triptamina	61,0 a (43)	8,2 b (133)	0,0 c	0,0 c
Serotonina	65,0 a (65)	0,7 b (205)	0,0 b	0,0 b

CV: coeficiente de variação. Valores com letras diferentes para cada linha (a-c) são significativamente diferentes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$).

3.2.2 Estudo da influência do tempo de contato da amostra sob agitação com bentonite

O tempo de contato do extrato com bentonite foi importante na retenção das aminos, como pode ser observado na tabela V.3. Os tempos de 15 e 30 min não foram significativamente diferentes e apresentaram maior retenção das aminos. Os valores de recuperação após 60 min de agitação foram maiores comparados após 15 e 30 min de

agitação. É possível que a bentonite tenha baixa estabilidade em meio ácido, que é comum em resinas com matrizes inorgânicas (COLLINS et al., 1997). Com isto, pode ter ocorrido hidrólise desta após muito tempo de contato com o meio.

Tabela V.3: Influência do tempo de agitação na recuperação de aminos bioativas em extrato ácido de queijo parmesão ralado após purificação com bentonite na proporção de 50,0 mg/mL

Aminas bioativas	% de recuperação (% CV) / tempo de agitação (min)			
	0	15	30	60
Histamina	20,9 b (15)	12,0 c (12)	15,6 bc (10)	41,0 a (13)
Tiramina	162,7 (22)	106,1 (2)	98,9 (53)	138,6 (14)
Espermina	0,0	0,0	0,0	0,0
Espermidina	0,0 b	0,0 b	0,0 b	1,2 a (46)
Agmatina	0,0 b	0,0 b	9,7 a (2)	9,3 a (88)
Putrescina	101,9 a (17)	51,7 c (9)	46,5 c (4)	80,2 b (15)
Cadaverina	103,1 a (15)	51,6 b (6)	43,1 b (13)	89,6 a (32)
Feniletilamina	106,5 a (10)	51,5 c (9)	54,3 c (16)	81,5 b (22)
Triptamina	0,0	0,0	0,0	0,0
Serotonina	0,0	0,0	0,0	0,0

CV: coeficiente de variação. Valores para cada linha (a-c) com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$).

Histamina apresentou retenção de quase 90% com tempos de agitação de 15 e 30 min. Tiramina não apresentou retenção em bentonite, permanecendo no extrato sem diferenças entre os tempos de agitação. As poliaminas espermina, espermidina e agmática e as indolaminas triptamina e serotonina ficaram totalmente retidas em bentonite nas condições avaliadas. Putrescina, cadaverina e feniletilamina apresentaram o máximo de retenção com 15 e 30 min com recuperações de aproximadamente 50%.

Apesar da bentonite apresentar um custo menor, como produto comercial, ela pode apresentar variações em sua composição (GOPINATH et al., 2003) e apresenta baixa estabilidade em meios ácidos e alcalinos comparada às resinas sintéticas (COLLINS et al., 1997), o que pode dificultar a eluição da histamina que ficou retida. No entanto, para tiramina que não foi retida, houve a eliminação completa das poliaminas e indolaminas interferentes e mais de 90% de histamina. Porém putrescina, cadaverina e feniletilamina

permaneceram no extrato em teores capazes de interferir na análise espectrofotométrica da tiramina. Além disso, não foi observada alteração perceptível dos extratos purificados diante da análise qualitativa da área inicial do cromatograma obtido por CLAE com par iônico, que é relativa à presença de aminoácidos e peptídeos. Com isto, supõe-se que os aminoácidos permaneceram como interferentes da tiramina.

3.3 PURIFICAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS POR TROCA ANIÔNICA

3.3.1 Perfil de retenção e eluição de histamina, tiramina, oito aminas bioativas e aminoácidos por resinas de troca aniônica

O perfil de aminas bioativas e aminoácidos presentes nos extratos purificados na resina Dowex1 - X8, seguindo o procedimento da AOAC (1995) para determinação de histamina em pescado está indicado nas figuras V.1 e V.2.

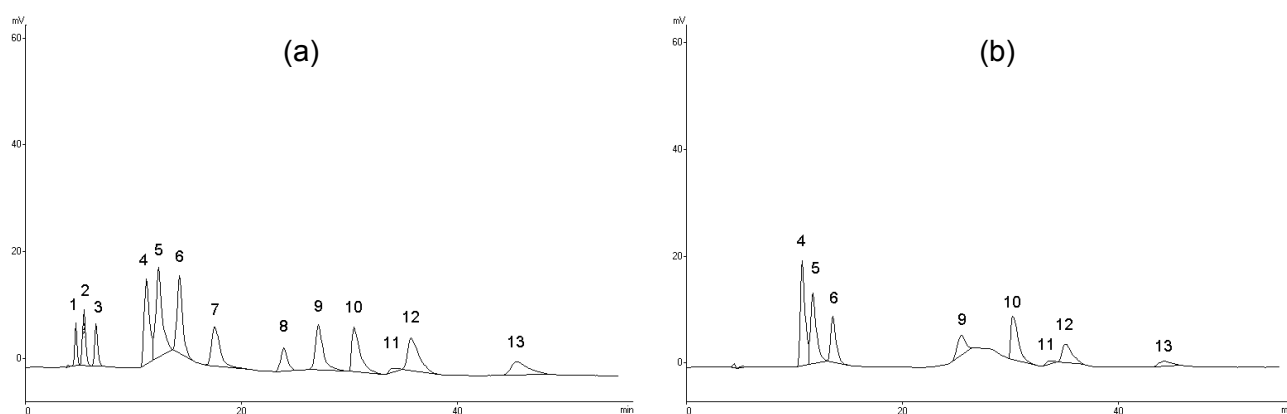


Figura V.1: Perfil cromatográfico de solução contendo dez aminas e três aminoácidos antes (a) e após (b) purificação em resina de troca aniônica Dowex1 - X8, 100 mesh, de acordo com o método descrito por AOAC (1995).

Condições cromatográficas: coluna μ Bondapak C_{18} (10 μ m, 3,9 x 300 mm, Waters, Milford, EUA), gradiente de eluição com acetonitrila e tampão pH 4,9 com octanossulfonato, fluxo 0,8 mL/min a 22 ± 1 °C, derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído e detecção fluorométrica a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão. 1: tirosina; 2: histidina; 3: fenilalanina; 4: putrescina; 5: cadaverina; 6: histamina; 7: tiramina; 8: serotonina; 9: agmatina; 10: espermidina; 11: espermina; 12: feniletilamina; 13: triptamina.

A resina de troca aniônica é capaz de reter substâncias fenólicas, o que explica a retenção de tiramina e serotonina. Os aminoácidos foram todos retidos, como pode ser observado na figura V.2, que apresenta nos primeiros 10 min de eluição da amostra, por

CLAE com par iônico, o conjunto de aminoácidos, peptídeos e outras substâncias presentes no extrato.

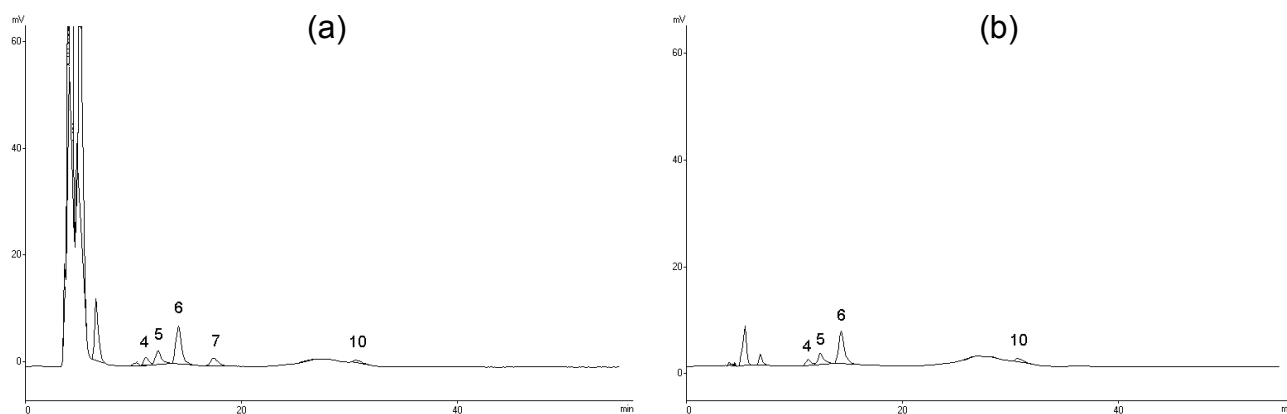


Figura V.2: Perfil cromatográfico do extrato metanólico de queijo parmesão ralado antes (a) e após (b) purificação em resina de troca aniônica Dowex1 - X8, 100 mesh, de acordo com o método descrito por AOAC (1995).

Condições cromatográficas: coluna μ Bondapak C₁₈ (10 μ m, 3,9 x 300 mm, Waters, Milford, EUA), gradiente de eluição com acetonitrila e tampão pH 4,9 com octanossulfonato, fluxo 0,8 mL/min a 22 ± 1 °C, derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído e detecção fluorométrica a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão. 4: putrescina; 5: cadaverina; 6: histamina; 7: tiramina; 10: espermidina.

As porcentagens de recuperação das aminas ao se purificar soluções contendo diferentes concentrações destas substâncias em resina Dowex1 - X8 estão apresentados na tabela V.4. Tiramina e serotonina, por serem compostos fenólicos, independente da concentração pesquisada, ficaram retidas na coluna. Triptamina e agmatina não foram detectadas na solução de 0,6 μ g/mL, sendo que agmatina na concentração seguinte (1,0 μ g/mL) apresentou coeficiente de variação muito elevado por sua concentração estar próxima ao limite de quantificação do método.

Tabela V.4: Recuperação das aminas bioativas após purificação em resina de troca aniônica Dowex1 - X8, 100 mesh, de acordo com o método descrito por AOAC (1995)

Concentração de amina (μ g/mL)	% Recuperação (% CV)									
	HIM	TIM	EPM	EPD	AGM	PUT	CAD	FEM	TRM	SRT
0,6	90,0 (30)	0,0	178,8 (3)	56,6 (1)	0,0	75,3 (6)	82,8 (16)	63,0 (1)	0,0	0,0
1,0	74,5 (5)	0,0	116,6 (13)	69,9 (16)	10,4 (94)	78,9 (7)	83,2 (7)	80,8 (25)	61,0 (31)	0,0
2,0	90,6 (11)	0,0	93,2 (10)	84,1 (16)	97,5 (21)	94,2 (12)	94,2 (15)	82,0 (11)	48,8 (32)	0,0

CV: coeficiente de variação; HIM: histamina; TIM: tiramina; EPM: espermina; EPD: espermidina; AGM: agmatina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEM: feniletilamina; TRM: triptamina; SRT: serotonina.

A resina Dowex1 - X8 foi eficiente na retenção da tiramina e de aminoácidos, deixando a histamina eluir com percentuais de recuperação de 75 a 91%. Entretanto, várias outras aminas foram eluídas, sendo que estas poderiam superestimar os resultados para histamina, uma vez que todas estas reagem com o-ftalaldeído ou demais reagentes utilizados comumente na derivação.

3.3.2 Influência do volume de água de lavagem na retenção das aminas bioativas

Os resultados obtidos ao se comparar 25,0 e 50,0 mL como volume de extração das aminas da resina Dowex1 - X8 estão apresentados na tabela V.5. O volume de água utilizado para lavagem da resina após adição da amostra foi importante na recuperação completa de algumas aminas não retidas. Para o procedimento descrito, foram necessários 50,0 mL de água para eluição completa da espermina, espermidina, putrescina e cadaverina. Histamina, agmatina, feniletilamina e triptamina não apresentaram diferenças significativas. Tiramina e serotonina permaneceram retidas completamente e o volume de água não interferiu nesta condição. De qualquer forma, o volume utilizado no procedimento da AOAC (1995), 50,0 mL, foi o selecionado para garantia da retirada de todas as aminas que não interagiram com os trocadores iônicos.

Tabela V.5: Influência do volume de água de lavagem na recuperação da histamina, tiramina e oito aminas bioativas purificadas de extrato metanólico de queijo parmesão ralado em resina de troca aniônica Dowex 1 X8 - 100, de acordo com o método descrito por AOAC (1995)

Volume de eluição com água (mL)	% Recuperação (CV)									
	HIM	TIM	EPM	EPD	AGM	PUT	CAD	FEM	TRM	SRT
25,0	70,3	0,0	60,5 b	61,5 b	77,4	67,6 b	65,7 b	66,5	30,1	0,0
	(15)		(5)	(4)	(11)	(7)	(8)	(14)	(24)	
50,0	90,6	0,0	93,2 a	84,1 a	97,5	94,2 a	94,2 a	82,0	48,8	0,0
	(11)		(10)	(16)	(21)	(12)	(15)	(11)	(32)	

HIM: histamina; TIM: tiramina; EPM: espermina; EPD: espermidina; AGM: agmatina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEM: feniletilamina; TRM: triptamina; SRT: serotonina; CV: coeficiente de variação. Valores para cada coluna (a-b) com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$).

3.3.3 Influência do tamanho da malha da resina e do número de ligações entre os grupos de poliestireno na retenção das aminas bioativas

Apenas quatro aminas apresentaram diferença significativa na porcentagem de recuperação em relação ao tamanho da malha (tabela V.6). Agmatina apresentou maior eluição e triptamina menor eluição em resina com malha maior. Tiramina e serotonina, que foram totalmente retidas em resina com malha menor, foram detectadas nos eluatos da resina com tamanho da malha maior (50 mesh). Desta forma, o tamanho da malha menor (100 mesh) utilizada no procedimento da AOAC (1995) foi mais adequado.

Tabela V.6: Influência do tamanho da malha da resina Dowex1 - X8, na recuperação da histamina, tiramina e oito aminas bioativas após purificação em resina de troca aniônica

Tamanho da malha (mesh)	% Recuperação (CV)									
	HIM	TIM	EPM	EPD	AGM	PUT	CAD	FEM	TRM	SRT
100	70,3	0,0 b	60,5	61,5	77,4 a	67,6	65,7	66,5	30,1 b	0,0 b
	(15)		(5)	(4)	(11)	(7)	(8)	(14)	(24)	
50	80,0	3,3 a	76,2	70,4	65,2 b	72,6	73,0	81,9	63,3 a	17,5 a
	(1)	(51)	(16)	(7)	(3)	(1)	(2)	(8)	(8)	(9)

HIM: histamina; TIM: tiramina; EPM: espermina; EPD: espermidina; AGM: agmatina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEM: feniletilamina; TRM: triptamina; SRT: serotonina; CV: coeficiente de variação. Valores para cada coluna (a-b) com letras diferentes são significativamente diferentes (Análise de variância, $p \leq 0,05$).

A variação da recuperação das aminas bioativas com o número de ligações entre os grupos de poliestireno pode ser observada na tabela V.7. A retenção de agmatina e triptamina foi afetada significativamente pelo número de ligações entre os grupos de poliestireno, mas o comportamento foi diferente para cada amina. Não era esperada a variação em relação às ligações cruzadas da resina, devido ao fato das aminas apresentarem baixa massa molecular.

Apesar de não ter havido diferença para a maioria das aminas entre o número de ligações entrecruzadas de poliestireno, a resina com pouco entrecruzamento (Dowex1 - X2) apresenta menos sítios trocadores de íons e menor seletividade (HARRIS, 2001). Com isto, a resina Dowex1 - X8 foi selecionada.

Tabela V.7: Influência do número de ligações entre os grupos de poliestireno na recuperação da histamina, tiramina e oito aminas bioativas após purificação em resina de troca aniônica

Resina	% Recuperação (CV)									
	HIM	TIM	EPM	EPD	AGM	PUT	CAD	FEM	TRM	SRT
Dowex1 - X8	70,3	0,0	60,5	61,5	77,4 a	67,6	65,7	66,5	30,1 b	0,0
100 mesh	(15)		(5)	(4)	(11)	(7)	(8)	(14)	(24)	
Dowex1 - X2	80,4	0,0	66,1	65,5	59,2 b	65,7	65,3	77,9	41,3 a	0,0
100 mesh	(4)		(4)	(5)	(3)	(5)	(7)	(3)	(5)	

HIM: histamina; TIM: tiramina; EPM: espermina; EPD: espermidina; AGM: agmatina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEM: feniletilamina; TRM: triptamina; SRT: serotonina; CV: coeficiente de variação. Valores para cada coluna (a-b) com letras diferentes são significativamente diferentes (Análise de variância, $p \leq 0,05$).

3.3.4 Eluição das aminas retidas e dos aminoácidos

Como pode ser observado na tabela V.8, a eluição de tiramina e serotonina, que ficaram retidas na resina de troca aniônica e a eluição dos aminoácidos não foram eficientes com HCl 0,1 mol/L e NaOH 0,1 e 2,0 mol/L.

Tabela V.8: Percentuais de recuperação de aminoácidos e aminas bioativas em solução padrão eluídas com soluções ácida e básica da resina Dowex1 - X8, 100 mesh

Eluente	% Recuperação										
	HIM	TIM	TIR	HIS	FEN	EPD	AGM	PUT	CAD	FEM	TRM
HCl 0,1 mol/L	1,4	3,7	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	2,4	1,8	10,8	23,6
NaOH 0,1 mol/L	4,8	0,1	28,8	2,4	6,1	4,0	1,3	0,6	0,0	3,9	0,0
NaOH 2,0 mol/L	0,4	5,7	15,6	13,3	8,6	0,0	0,0	1,1	0,0	8,3	0,0

HIM: histamina; TIM: tiramina; TIR: tirosina; HIS: histidina; FEN: fenilalanina; EPD: espermidina; AGM: agmatina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEM: feniletilamina; TRM: triptamina. Serotonina e espermidina não foram detectadas em nenhuma das três condições.

Com ácido clorídrico, não houve eluição de aminoácidos e apenas traços de tiramina. No entanto, foi observada recuperação de 24% de triptamina e 11% de feniletilamina e traços de outras aminas. Triptamina e feniletilamina apresentaram baixa recuperação no procedimento descrito pela AOAC (1995), com lavagem da resina, após

adição da amostra, com água. Para melhor recuperação destas duas aminas na etapa anterior, é provável que a lavagem da resina deva ser com um ácido diluído como o HCl 0,1 mol/L.

Com NaOH 0,1 mol/L, houve eluição apenas de pequenas quantidades de algumas aminas e em relação aos aminoácidos quantificados, obteve-se 29% de tirosina, 2% de histidina e 6% de fenilalanina. Com NaOH 2,0 mol/L, a eluição foi semelhante com apenas traços de aminas e baixa recuperação dos aminoácidos testados.

A Dowex1 – X8 é uma resina de troca aniônica fortemente básica, que leva a uma interação com os ânions, que não são facilmente quebradas. Desta forma para a eluição de ânions, são necessárias condições mais extremas, como concentrações de soluções alcalinas mais concentradas.

Após eluição com tampão fosfato em pH 5,5 da resina Dowex1 - X8 adicionada de extrato etanólico, houve recuperação de apenas 18,3% da tiramina adicionada. Além disto, também foram eluídos os aminoácidos como pode ser observado na figura V.3. Desta forma, nenhuma das condições testadas foi eficiente na eluição de tiramina.

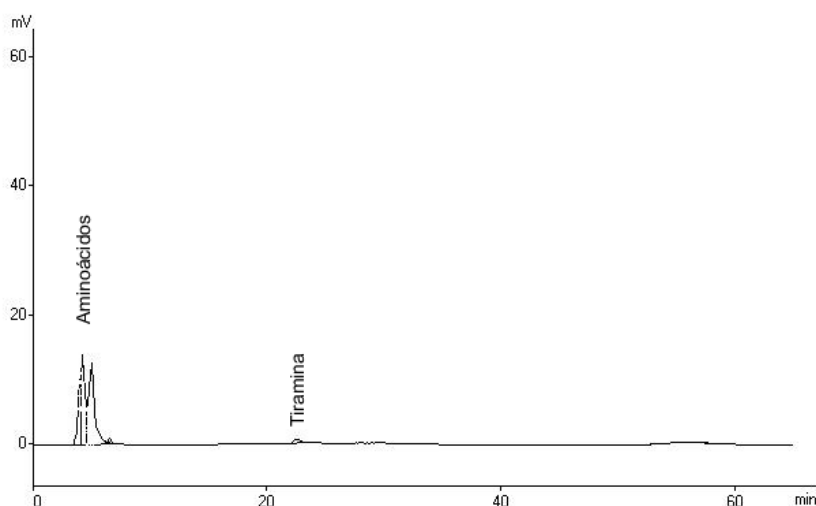


Figura V.3: Perfil cromatográfico do extrato etanólico de queijo parmesão ralado purificado em resina de troca aniônica Dowex1 - X8, 100 mesh e eluído com tampão fosfato em pH 5,5.

Condições cromatográficas: coluna μ Bondapak C₁₈ (10 μ m, 3,9 x 300 mm, Waters, Milford, EUA), gradiente de eluição com acetonitrila e tampão pH 4,9 com octanossulfonato, fluxo 0,8 mL/min a 22 ± 1 °C, derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído e detecção fluorométrica a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão.

3.4 PURIFICAÇÃO DE HISTAMINA E TIRAMINA POR TROCA CATIÔNICA

3.4.1 Purificação de histamina e tiramina em cartuchos de troca iônica

A retenção de todas as aminas em resina de troca catiônica fortemente ácida, como nos cartuchos IC-H e IC-Na e na resina AG® 50W – X8, ocorreu em função da interação forte entre os grupos sulfônico e amino. Esta retenção foi observada mesmo após lavagem dos cartuchos e da resina com água e HCl 0,1 mol/L. Nas amostras adicionadas na coluna com resina AG® 50W – X8, a lavagem com água retirou pequena parte de aminoácidos, os quais aparecem nos primeiros 10 min no cromatograma, mas para eluição adequada dos aminoácidos sem eluição das aminas, seria necessário utilizar uma solução tampão em pH menor que 6,0.

No cartucho IC-Chelate que é indicado para retenção de cátions polivalentes, foi observada pequena eluição das aminas com água com percentuais menores que 10%, exceto para serotonina que apresentou recuperação em torno de 30%. Após eluição com HCl 0,1 mol/L, todas as aminas foram eluídas com percentuais de recuperação acima de 100%, indicando a presença de possíveis interferentes da resina.

3.4.2 Teste preliminar de separação de histamina e tiramina

Histamina e tiramina ficaram retidas na resina de troca catiônica, mesmo após a lavagem com solução tampão pH 5,6 (tabela V.9). A força iônica conferida pela solução de NaCl 3,0 mol/L foi eficiente para eluição principalmente da histamina; foi observada eluição 5,4 vezes maior da histamina em relação a tiramina com o eluente tamponado em pH 5,6 e 3,8 vezes maior com eluente tamponado em pH 6,6. Com solução tampão pH 6,6 a histamina foi eluída e tiramina não apresentou eluição relevante. Este perfil de eluição pode estar relacionado ao pKa do grupo imidazol da histamina.

Após eluição com solução contendo NaCl 0,35 mol/L e KCl 0,35 mol/L, foram detectados traços de histamina (0,04 µg/mL) e tiramina (0,05 µg/mL), que podem ser observados na figura V.4. Com a adição de isopropanol 30%, a extração de ambas aminas foi mais eficiente (0,45 µg/mL), mas a recuperação foi muito baixa (aproximadamente 5%). Isto indica, conforme CINQUINA et al. (2004), que a utilização de um solvente orgânico polar pode favorecer a eluição de aminas. No entanto, a princípio, este não se apresentou específico para histamina ou tiramina.

Tabela V.9: Concentração encontrada nas frações coletadas de histamina e tiramina eluídas da resina AG® 50W - X8 com diferentes soluções

Eluentes	Concentração das aminas em cada fração (µg/mL)											
	Histamina						Tiramina					
	F1	F2	F3	F4	F5	FT (%)	F1	F2	F3	F4	F5	FT (%)
Tampão fosfato pH 5,6	nd	nd	nd	0,14	-	< 0,1	nd	nd	nd	0,16	-	< 0,1
NaCl 3,0 mol/L (pH 5,6)	10,51	29,06	38,54	40,63	-	35,6	3,36	6,35	6,26	6,19	-	6,6
Tampão fosfato pH 6,6	27,88	10,08	2,29	-	-	20,1	4,53	3,28	1,23	-	-	4,5
NaCl 3,0 mol/L (pH 6,6)	17,49	17,81	15,11	13,39	10,42	22,3	3,72	3,54	3,88	4,39	3,98	5,9
Tampão borato pH 8,0	3,89	0,16	0,08	-	-	3,02	2,38	0,33	0,16	-	-	4,13
NaOH 0,1 mol/L	3,02	-	-	-	-	-	6,89	-	-	-	-	-

nd: não detectado (limite de detecção: histamina < 0,05 µg/mL; tiramina < 0,01 µg/mL); - não coletado; F: frações de 5 mL; FT: total da amina encontrada na soma das frações.

Com a solução contendo NaCl 1,0 mol/L e KCl 1,0 mol/L, as duas aminas foram eluídas em proporções diferentes, semelhante a eluição com solução de NaCl 3,0 mol/L. A concentração da tiramina (0,5 µg/mL) foi 10 vezes menor que da histamina (5,1 µg/mL). Foi avaliado um volume maior desta solução e observou-se que após aproximadamente 40 mL ainda havia a presença das duas aminas (figura V.4).

3.4.3 Perfil de separação de histamina e tiramina na presença de oito aminas bioativas e aminoácidos

No estudo preliminar com tampão 5,6 não foi observada a eluição de nenhuma das dez aminas estudadas. Com solução de NaCl 0,5 mol/L tamponada em pH 5,6 foram eluídas baixas concentrações de putrescina (7% da quantidade adicionada), cadaverina (2%), tiramina (6%), feniletilamina (5%) e serotonina (1%). Após eluição com 44,0 mL de NaCl 1,0 mol/L, tamponado em pH 5,6, foram obtidos 92% de putrescina seguidos de 46% de cadaverina, 42% de tiramina, 30% de histamina, 11% de serotonina, 9% de feniletilamina, 8% de agmatina e 7% de espermidina. Não foi observada a eluição diferenciada entre tiramina e histamina, como foi encontrado na eluição apenas das duas aminas com solução de NaCl 3,0 mol/L tamponado em pH 5,6. Após eluição com a solução contendo NaCl e KCl 0,5 mol/L e a solução contendo NaCl e KCl 1,0 mol/L,

observou-se a eluição de todas as aminos, não sendo este eluente eficaz para a separação das aminos pesquisadas.

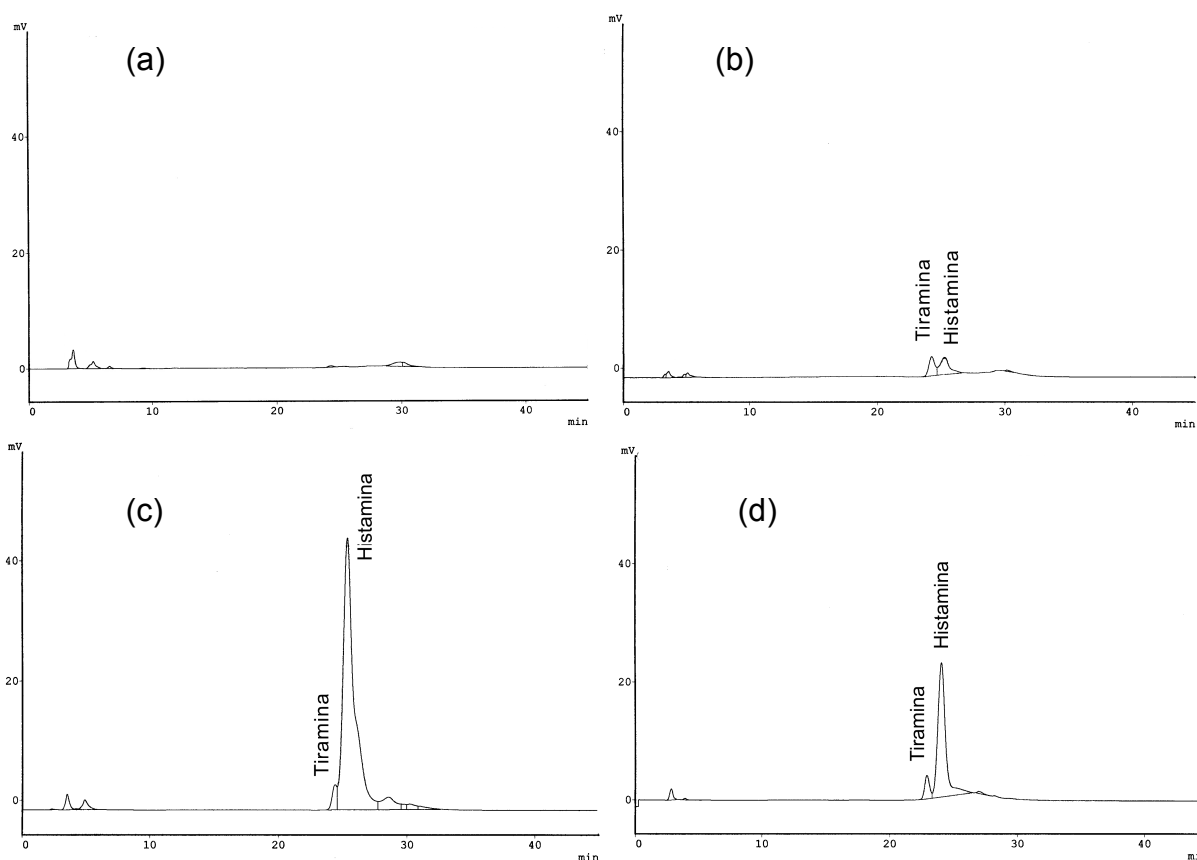


Figura V.4: Cromatograma da tiramina e histamina em diferentes eluatos obtidos por troca catiônica com resina AG® 50W - X8 e eluição com (a) solução salina 0,7 mol/L; (b) solução salina 0,7 mol/L com 30% de isopropanol; (c) 5 mL e (d) após 40 mL de solução salina 2,0 mol/L tamponada em pH 5,6.

Condições cromatográficas: coluna μ Bondapak C₁₈ (10 μ m, 3,9 x 300 mm, Waters, Milford, EUA), gradiente de eluição com acetonitrila e tampão pH 4,9 com octanossulfonato, fluxo 0,8 mL/min a 22 ± 1 °C, derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído e detecção fluorométrica a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão. 1: tirosina; 2: histidina; 3: fenilalanina; 4: putrescina; 5: cadaverina; 6: histamina; 7: tiramina; 8: serotonina; 9: agmatina; 10: espermidina; 11: espermina; 12: feniletilamina; 13: triptamina.

Não houve eluição relevante de aminos bioativas com soluções tampão em pH 7,0 e pH 5,2, mesmo adicionando metanol (tabela V.10). No entanto, só houve eluição significativa de aminoácidos com solução tampão contendo 20% do solvente orgânico metanol, no entanto esta eluição não foi completa (tabela V.11). Foi observada eluição dos aminoácidos com HCl 1,0 mol/L; no entanto, todas as aminos bioativas foram eluídas em proporções diferenciadas, sendo que a tiramina apresentou a maior recuperação.

Tabela V.10: Perfil da eluição de dez aminas bioativas com diferentes eluentes em resina de troca catiônica

Eluente	% Recuperação (%CV)									
	HIM	TIM	EPM	EPD	AGM	PUT	CAD	FEM	TRM	SRT
Tampão acetato pH 5,2	0	0	0	2,2 (8)	1,0 (173)	0	1,5 (173)	0	0	0
Tampão acetato pH 5,2 / 20% metanol	2,6 (89)	5,3 (87)	0	1,9 (17)	0	0,2 (173)	0	0,1 (173)	0	0
Tampão fosfato pH 7,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
HCl 1,0 mol/L	8,6 (14)	57,3 (2)	16,8 (5)	2,7 (18)	7,2 (6)	13,3 (7)	15,9 (4)	30,4 (2)	11,5 (18)	14,0 (9)
NaCl 2,0 mol/L pH 5,2	40,9 (11)	14,3 (11)	28,8 (4)	40,6 (13)	26,6 (9)	71,6 (14)	51,2 (11)	17,9 (12)	7,9 (10)	0,2 (173)
NaCl 2,0 mol/L pH 5,2 / 20% CH ₃ CN:MeOH 1:1	69,3 (2)	41,1 (2)	132,7 (3)	190,7 (4)	136,1 (0,5)	88,8 (1)	63,9 (2)	110,6 (4)	-	-
NaCl 3,0 mol/L pH 7,0	48,0 (3)	0	0	155,6 (7)	96,7 (6)	84,0 (21)	52,1 (11)	0	0	-
NaCl 3,0 mol/L pH 8,0	45,3 (7)	0	82,5 (90)	141,6 (8)	83,7 (8)	64,7 (15)	44,0 (8)	0	0	-

CV: coeficiente de variação; HIM: histamina; TIM: tiramina; EPM: espermina; EPD: espermidina; AGM: agmatina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEM: feniletilamina; TRM: triptamina; SRT: serotonina; CH₃CN: acetonitrila; MeOH: metanol; -: não determinado.

Tabela V.11: Perfil da eluição de aminoácidos com diferentes eluentes em resina de troca catiônica

Eluente	% Recuperação (%CV)			
	HIS	TIR	FEN	Área total de aminoácidos
Tampão acetato pH 5,2 ¹	0	3,9 (88)	2,9 (88)	1,4 (88)
Tampão acetato pH 5,2 / 20% metanol ¹	32,3 (87)	58,3 (28)	45,3 (5)	46,7 (17)
Tampão fosfato pH 5,6 ¹	-	-	-	10,0 (22)
Tampão fosfato pH 7,0 ²	-	-	-	10,0 (22)
HCl 1,0 mol/L ¹	5,5 (173)	131,3 (2)	79,5 (4)	45,2 (13)
NaCl 2,0 mol/L pH 5,2 ¹	208,6 (25)	67,0 (19)	57,8 (9)	88,7 (15)
NaCl 2,0 mol/L pH 5,2 / 20% CH ₃ CN:MeOH (1:1) ²	-	-	-	47,8 (5)
NaCl 3,0 mol/L pH 7,0 ²	-	-	-	43,9 (12)
NaCl 3,0 mol/L pH 8,0 ²	-	-	-	43,1 (11)

CV: coeficiente de variação; HIS: histidina; TIR: tirosina; FEN: fenilalanina; CH₃CN: acetonitrila; MeOH: metanol; -: não determinado. ¹ Avaliação com solução padrão. ² Avaliação com extrato ácido de queijo parmesão ralado.

As soluções salinas não foram seletivas, i.e., houve eluição de aminoácidos e aminas bioativas. Os estudos com solução de NaCl 3,0 mol/L foram realizados com extrato ácido de queijo parmesão ralado e a não recuperação de espermina, tiramina, feniletilamina e triptamina pode ser devido aos seus baixos teores iniciais, além da própria ineficácia do eluente em retirá-las da resina.

A adição de solvente orgânico (acetonitrila e metanol) na solução de NaCl 2,0 mol/L, aumentou a eluição de todas as aminas bioativas; no entanto, isto não foi observado para os aminoácidos.

4 CONCLUSÕES

A purificação com SEP-PAK C₁₈ não foi seletiva e não apresentou valores de recuperação adequados para a maioria das aminas.

Durante a purificação de extrato ácido de queijo parmesão ralado com bentonite, observou-se que o tempo de agitação e a quantidade afetou significativamente os resultados, sendo a melhor condição de retenção a agitação por 15 a 30 min na presença de 50,0 mg de bentonite por mL de extrato.

Ao utilizar a resina de troca iônica na purificação de aminas, observou-se que não houve variação na eluição da maioria das aminas bioativas com diferentes volumes de água de lavagem, tamanhos da malha da resina e números de ligações cruzadas da matriz da resina. Tiramina e serotonina ficaram menos retidas na resina Dowex1 - X8 com tamanho da malha maior (50 mesh), sendo mais adequado utilizar a resina com malha de tamanho menor (100 mesh).

As aminas fenólicas (tiramina e serotonina) ficaram retidas na resina de troca aniônica e não foram eluídas eficientemente pelos eluentes testados. Os aminoácidos também ficaram retidos na resina de troca aniônica. Desta forma, é possível analisar histamina e demais aminas que não foram retidas na resina de troca aniônica sem a interferência dos aminoácidos.

As aminas bioativas ficaram retidas fortemente na resina de troca catiônica testada. As soluções tampão não eluíram as aminas bioativas e não foram eficientes na eluição dos aminoácidos. A adição de solvente orgânico na solução tampão aumentou a eluição dos aminoácidos. Nenhuma das soluções eluentes testadas foi capaz de purificar seletivamente histamina e tiramina.

CONCLUSÕES INTEGRADAS E SUGESTÕES

Foram detectadas, nas amostras de queijo ralado analisadas no período de 2005 a 2006, as dez aminas investigadas. Espermina, espermidina, agmatina, feniletilamina, triptamina e serotonina estavam presentes em baixos teores. Putrescina e cadaverina foram encontradas na maioria das amostras em altos teores, podendo potencializar o efeito tóxico da histamina. Histamina e tiramina foram detectadas em 100% das amostras, sendo que em 62% poderiam causar efeitos tóxicos adversos a saúde humana. Ainda não se tem relatos sobre os efeitos tóxicos do uso contínuo destas substâncias. Desta forma, este estudo reafirma a necessidade de que os teores de tiramina e histamina em queijos ralados sejam um critério de qualidade higiênico-sanitário.

A partir dos resultados da correlação, sugere-se, quando a análise de histamina e tiramina separadamente não for possível, o uso alternativo dos teores de aminas biogênicas, aminas totais ou da soma de histamina e tiramina para avaliar a aptidão do queijo utilizado como matéria-prima para queijo ralado.

Histamina apresentou recuperação adequada na extração com HCl 1,0 mol/L, etanol fervente e tampão borato. Tiramina apresentou recuperação adequada na extração com HCl 1,0 mol/L e etanol fervente. A extração com HCl 1,0 mol/L permitiu recuperação adequada da maioria das aminas de queijo ralado. Além disto, este foi um procedimento relativamente simples, barato e rápido. Portanto, deveria ser utilizado para extração de aminas de amostras de queijo.

Na extração com etanol fervente, as aminas biogênicas (histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, feniletilamina e triptamina) apresentaram recuperações adequadas, enquanto as poliaminas não foram extraídas. Este solvente poderia ser utilizado na extração seletiva de aminas biogênicas.

Nenhum dos dois procedimentos de derivação foi específico para histamina e tiramina. Desta forma, são necessários métodos de purificação e separação para determinação de histamina e tiramina. A derivação com ninidrina é um procedimento mais simples e os produtos são mais estáveis que a derivação com DnsCl.

A extração alcalina de aminas de queijo seguida pela purificação por partição líquido-líquido com éter etílico em pH 10 permitiu recuperação adequada de histamina e tiramina. Entretanto este procedimento não foi seletivo para histamina e tiramina. As principais aminas interferentes nesta etapa foram feniletilamina e triptamina, que foram

particionadas seletivamente por clorofórmio. Como sugestão, pode-se avaliar a partição consecutiva de clorofórmio e éter etílico na purificação de histamina e tiramina.

Não foi alcançada purificação seletiva de histamina e tiramina por extração em fase sólida. As aminas fenólicas (tiramina e serotonina) ficaram retidas na resina de troca aniônica e não foram eluídas eficientemente pelos eluentes testados. Os aminoácidos também ficaram retidos na resina de troca aniônica. Desta forma, é possível analisar histamina e as demais aminas que não foram retidas na resina de troca aniônica sem a interferência dos aminoácidos.

As aminas bioativas ficaram retidas fortemente na resina de troca catiônica testada. As soluções tampão não eluíram as aminas bioativas e não foram eficientes na eluição dos aminoácidos. A adição de solvente orgânico na solução tampão aumentou a eluição dos aminoácidos. Nenhuma das soluções eluentes testadas foi capaz de purificar seletivamente alguma das aminas bioativas.

A análise de histamina e tiramina separadamente não foi viável nas condições testadas. No entanto, a partir dos resultados de correlação de histamina, tiramina e aminas biogênicas, a análise de aminas biogênicas, exceto tiramina, como índice da qualidade de queijo, pode ser avaliada pela seqüência de extração com HCl ou etanol, purificação por troca aniônica utilizando-se a resina Dowex1 - X8, seguida de quantificação por espectrofotometria de absorção molecular após derivação com ninidrina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABABOUC, L.; AFILAL, M.E.; BENABDELJELIL, H.; BUSTA, F.F. Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25 – 28 °C) and in ice. *Int. J. Food Sci. Technol.*, v. 26, p. 297-306, 1991.
- ANTOINE, F.R.; WEI, C.; OTWELL, W.S.; SIMS, C.A.; LITTELL, R.C.; HOGLE, A.D.; MARSHALL, M.R. Gas chromatographic analysis of histamine in Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 4754-4759, 2002.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução n. 12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 10 jan. 2001, p. 45-53.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official methods of analysis*. 16. ed. Washington: AOAC, 1995. método 35.1.32.
- AYGÜN, O.; SCHNEIDER, E.; SCHEUER, R.; USLEBER, E.; GAREIS, M.; MÄRTLBAUER E. Comparison of ELISA and HPLC for the determination of histamine in cheese. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, p. 1961-1964, 1999.
- BAKER, G.B.; WONG, J.T.F.; COUTTS, R.T.; PASUTTO, F.M. Simultaneous extraction and quantitation of several bioactive amines in cheese and chocolate. *Chromatographia*, v. 19, p. 317-331, 1987.
- BAILEY, S.R.; MARR, C.M.; ELLIOTT, J. Identification and quantification of amines in the equine caecum. *Res. Veterin. Sci.*, v. 74, p. 113-118, 2003.
- BARÁTH, A.; SAWISKY, J.; HALÁSZ, A. Methods for the determination of biogenic amine content in food products. *Eurofood Chim.*, v. 18, n. 20, p. 282-286, 1995.
- BARBANTI, D.; D'ORAZIO, M.; VERSARI, A. The use of bentonite as a moisture regulating system: 1. Study on some sorption properties of bentonite for their potential use in food technology. *J. Food Engineering*, v. 33, n. 1/2, p. 193-206, 1997.
- BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; RALPH, A.; PUSZTAL, A. Polyamines in food – implications for growth and health. *J. Nutr. Biochem.*, v. 4, p. 66-71, 1993.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 6, n. 10, p. 341-346, 1995.
- BATEMAN, R.C.; ELDRIGE, D.B.; WADE, S.; McCOY-MESSER, J.; JESTER, E.L.E.; MOWDY, D.E. Copper chelation assay for histamine in tuna. *J. Food Sci.*, v. 59, n. 3, p. 517-518, 543, 1994.

- BELLÉ, N.A.V.; DALMOLIN, G.D.; FONINI, G.; RUBIN, M.A.; TEIXEIRA, J.B.T. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. *Brain Res.*, v. 1008, p. 245-251, 2004.
- BILIC, N. Rapid identification of biogenic amine-producing bacterial cultures using isocratic high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 719, p. 321-326, 1996.
- BOUCHEREAU, A.; GUÉNOT, P.; LARHER, F. Analysis of amines in plant materials. *J. Chromatogr. B*, v. 747, p. 49-67, 2000.
- BOVER-CID, S.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M.C. Influence of hygienic quality of raw materials on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages. *J. Food Protect.*, v. 63, n. 11, p. 154-1550, 2000.
- BOZKURT, H.; ERKMEN, O. Formation of biogenic amines in Turkish style sausage during ripening and storage periods. *J. Food Qual.*, v. 25, p. 317-332, 2002.
- BRASIL. Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Portaria n. 357 de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 8 set. 1997, 5p.
- BRASIL. Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Portaria n. 63 de 13 de novembro de 2002. Projeção de Instrução Normativa que trata dos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Conserva de Peixes, Conservas de Sardinhas e Conserva de Atum e Bonito. *Diário Oficial da União*, Brasília, 28 nov. 2002, seção 1, p. 12.
- BUSTO, O.; MESTRES, M.; GUASCH, J.; BORRULL, F. Determination of biogenic amines in wine after clean-up by solid-phase extraction. *Chromatographia*, v. 40, n. 7/8, p. 404-410, 1995.
- BUTS, J.P.; KEYSER, N.; RAEDEMAEKER, L.; COLLETTE, E. SOKAL, E.M. Polyamine profiles in human milk, infant artificial formulas, and semi-elemental diets. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutr.*, v. 21, p. 44-49, 1995.
- CABEZA, A.S.; MARTINEZ, Y.M.; LEGUA, C.M.; FALCÓ, P.C. Rapid fluorimetric assay for primary amine groups in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 376, p. 918-922, 2003.
- CALBIANI, F.; CARERI, M.; ELVIRI, L.; MANGIA, A.; PISTARA, L.; ZAGNONI, I. Rapid assay for analyzing biogenic amines in cheese: matrix solid-phase dispersion followed by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 3779-3783, 2005.
- CASAL, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; FERREIRA, M.A. Determination of biogenic amines in coffee by an optimized liquid chromatographic method. *J. Liquid Chromatogr. Related Technol.*, v. 25, n.16, p. 2535-2549, 2002.
- CHANG, S.F.; AYRES, J.W.; SANDINE, W.S. Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine and tryptophane. *J. Dairy Sci.*, v. 68, p. 2840-2846, 1985.

- CINQUINA, A.L.; CALÌ, A.; LONGO, F.; DE SANTIS, L.; SEVERONI, A.; ABBALLE, F. Determination of biogenic amines in fish tissues by ion-exchange chromatography with conductivity detection. *J. Chromatogr. A*, v. 1032, p.73-77, 2004.
- CLIFFE, A.J.; LAW, B.A. A time course study of peptide production in accelerated-ripened Cheddar cheese using reverse phase high performance liquid chromatography. *Food Biotechnol.*, v. 5, n. 1, p. 1-17, 1991.
- COBO, M.; SILVA, M. Continuous solid-phase extraction and dansylation of low-molecular-mass amines coupled on-line with liquid chromatography and peroxyoxalate chemiluminescence-based detection. *J. Chromatogr. A*, v. 848, p. 105-115, 1999.
- CODEX ALIMENTARIUS. *Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos*. 1. ed. Roma, 1993. v. 3.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (Coord.). *Introdução a métodos cromatográficos*. 7^a ed. Campinas: UNICAMP, 1997. 279 p.
- CONCA, R.; BRUZZONITI, M.C.; MENTASTI, E.; SARZANINI, C.; HAJOS, P. Ion chromatographic separation of polyamines: putrescine, spermidine and spermine. *Anal. Chim. Acta*, v. 439, p. 107-114, 2001.
- COSENTINO, S.; PISANO, M.B.; CORDA, A.; FADDA, M.E.; PIRAS, C. Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *J. Dairy Res.*, v. 71, p. 444-450, 2004.
- DELOYER, P.; PEULEN, O.; DANDRIFOSSE, G. Dietary polyamines and non-neoplastic growth and disease. *Eur. J. Gastroent. Hepatol.*, v. 13, p. 1027-1032, 2001.
- DESSER, H.; BANDION, F. Changes in concentration of biogenic amines in wine resulting from various winemaking procedures and during storage of bottled wine. *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Früchteverwertung*, v. 35, n. 1, p. 16-19, 1985.
- Di MUCCIO, A.; GIROLIMETTI, S.; BARBINI, D.A.; PELOSI, P.; GENERALI, T.; VERGORI, L.; De MERULIS, G.; LEONELLI, A.; STEFANELLI, P. Selective clean-up applicable to aqueous acetone extracts for the determination of carbendazim and thiabendazole in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatogr. A*, v. 833, p. 61-65, 1999.
- DRAISCI, R., GIANNETTI, L.; BORIA, P.; LUCENTINI, L.; PALLESCHI, L.; CAVALLI, S. Improved ion chromatography-integrated pulsed amperometric detection method for the evaluation of biogenic amines in food of vegetable or animal origin and in fermented food. *J. Chromatogr. A*, v. 798, p. 109-116, 1998.
- EDWARDS, S.T.; SANDINE, W.E. Public health significance of amines in cheese. *J. Dairy Sci.*, v. 64, p. 2431-2438, 1981.
- EL-SAYED, M.M. Biogenic amines in processed cheese available in Egypt. *Int. Dairy J.*, v. 6, p. 1079-1086, 1996.

- ESSINGTON, M.E. Adsorption of aniline and toluidines on montmorillonete. *Soil Sci.*, v. 158, n. 3, p. 181-188, 1994.
- FELDMAN, K.A.; WERNER, S.B.; CRONAN, S.; HERNANDEZ, M.; HORVATH, A.R.; LEA, C.S.; AU, A.M.; VUGIA, D.J. A large outbreak of scombroid fish poisoning associated with eating escolar fish (*Lepidocybium flavobrunneum*). *Epidemiol. Infect.*, v. 133, p. 29-33, 2005.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; TOMILLO, J.; NÚÑEZ, M. Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 52, p. 189-196, 1999.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; TOMILLO, J.; NÚÑEZ, M. Formation of biogenic amines in raw milk Hispánico cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture. *J. Food Protect.*, v. 63, n. 11, p. 1551-1555, 2000.
- FLORES, H.E.; PROTACIO, C.M.; SIGNS, M.W. Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. *Phytochem.* v. 23, p. 329-393, 1989.
- FRANCO, R.M.; ALMEIDA, L.E.F. Avaliação microbiológica de queijo ralado, tipo parmesão, comercializado em Niterói, RJ. *Hig. Alim.*, v. 6, n. 1, p. 33-36, 1992.
- GAYA, P.; SÁNCHEZ, C.; NUÑEZ, M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. Proteolysis during ripening of Manchego cheese made from raw or pasteurized ewes' milk - Seasonal variation. *J. Dairy Res.*, v. 72, p. 287-295, 2005.
- GENNARO, M.C.; GIANOTTI, V.; MARENGO, E.; PATTONO, D.; TURI, R.M. A chemometric investigation of the effect of the cheese-making process on the contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). *Food Chem.*, v. 82, p. 545-551, 2003.
- GILMAN, A.; HARDMAN, J.; LIMBIRD, L. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2003. 1647 p.
- GLÓRIA, M.B.A.; SOARES, V.F.M. Comparação de métodos fluorimétricos para a determinação da histamina em pescado. *Arq. Biol. Tecnol.*, v. 36, n. 2, p. 229-235, 1993.
- GLÓRIA, M.B.A.; DAESCHEL, M.A. Metodologia para determinação de amins biogênicas em bebidas. In: Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 9, 1995, João Pessoa. *Livro de Resumos ...* João Pessoa: UFP, 1995. p. 137.
- GLÓRIA, M.B.A.; WATSON, B.T.; SIMON-SARKADI, L.; DAESCHEL, M.A. A survey of biogenic amines on Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, v. 49, n. 3, p. 280-282, 1998.
- GLÓRIA, M.B.A. Amines. In: HUI, H.; NOLLET, L.L. (Ed.) *Handbook of Food Science*. New York: Marcel Dekker, 2005.

- GOPINATH, T.R.; CRUZ, V.C.A.; FREIRE, J.A. Estudo comparativo da composição química e as variedades de argilas bentoníticas da região de Boa Vista, Paraíba. *Rev. Geol.*, v. 16, n.1, p. 35-48, 2003.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 5, n. 2, p. 42-49, 1994.
- HARDUF, Z.; NIR, T.; JUVEN, B.J. High performance liquid chromatography of biogenic amines derivatized with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *J Chromatogr.*, v. 437, p. 379-386, 1988.
- HARRIS, D.C. *Análise Química Quantitativa*. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 862 p.
- HILLARY, R.A.; PEGG, A.E. Descarboxylases involved in polyamine biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. *Biochim. Bioph. Acta*, v. 1647, p. 161-166, 2003.
- HOFFMANN, F.L.; GONÇALVES, T.M.V.; COELHO, A.R.; HIROOKA, E.Y.; HOFFMANN, P. Qualidade microbiológica de queijos ralados de diversas marcas comerciais, obtidos do comércio varejista do município de São Jose do Rio Preto, SP. *Hig. Alim.*, v. 18, n. 122, p. 62-66, 2004.
- HUI, J.Y.; TAYLOR, S.L. Inhibition of *in vivo* histamine metabolism in rats by foodborne and pharmacologic inhibitors of diamine oxidase, histamine N-methyl transferase, and monoamine oxidase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 8, p. 241-249, 1985.
- HURST, W.J. A review of HPLC methods for the determination of selected biogenic amines in food. *J. Liquid Chromatogr.*, v. 13, n. 1, p. 1-23, 1990.
- IBE, A.; SAITO, K.; NAKAZATO, M.; KIKUCHI, Y.; FUJINAMA, K.; NISHIMA, T. Quantitative determination of amines by liquid chromatography. *J Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 74, n. 4, p 695-698, 1991.
- IENISTEA, C. Significance and detection of histamine in food. In: HOBBS, B.C.; CHRISTIAN, J.H.B. (Ed.). *The microbiological safety of food*. London: Academic Press, 1973. p. 327-343.
- IFT (Institute of Food Technologists). Nitrate, nitrite, and nitroso compounds in foods. *Food Technol.*, v. 41, n. 4, p. 127-136, 1987.
- INGLES, D.L.; TINDALE, C.R.; GALLIMORE, D. Recovery of biogenic amines in chocolate. *Chem. Ind.*, p. 432-433, 1978.
- INGLES, D.L.; BACK, F.J.; GALLIMORE, D.; TINDALE, R.C.; SHAW, J.K. Estimation of biogenic amines in foods. *J. Sci. Food Agric.*, v. 36, p. 402-406, 1985.
- INOCENTE, N.; D'AGOSTIN, P. Formation of biogenic amines in a typical semihard Italian cheese. *J. Food Protect.*, v. 65, n. 9, p. 1498-1501, 2002.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; VIDAL-CAROU, M.C.; MARINE-FONT, A. Determination of biogenic amines in beers and their raw materials by ion-pair liquid chromatography with post column derivatization. *J. AOAC Int.*, v. 76, n. 5, p. 1027-1032, 1993.

- JAKOB, L. Adsorption of histamine and acetylcholine in the bentonite treatment of wine. *Weinberg und Keller*, v. 15, n, 10, p. 555-560, 1968.
- JALON, M.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.C.; MARINE-FONT, A. Tyramine in cocoa and derivatives. *J. Food Sci.*, v. 48, p. 545-547, 1983.
- JANOSZKA, B.; BLASZCZYK, WARZECHA, L.; B.; STRÓZYK, M.; DAMASIEWICZ-BODZEK, A.; BODZEK, D. Clean-up procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines (aminoazaarenes) from heat-treated meat samples. *J. Chromatogr. A*, v. 938, p. 155-165, 2001.
- JOHNSTON, R.B. *Laboratory manual for biochemistry*. Minneapolis: Burgess, 1958. 186p.
- JOOSTEN, H.M.L.J. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese: 3. factors influencing the amounts formed. *Neth. Milk Dairy J.*, v. 41, p. 329-357, 1987.
- JOOSTEN, H.M.L.J.; NORTHOLT, M.D. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese: 2. Decarboxylative properties of some non-starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J.*, v. 41, p. 259-279, 1987.
- JOOSTEN, H.M.L.J.; OLIEMAN, C. Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by high performance liquid chromatography in combination with thermo-sensitized reaction detection. *J. Chromatogr.*, v. 356, p. 311-319, 1986.
- KALAC, 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.
- KIM, Y.T.; GLERUM, C.; NOLAND, T.L.; HICKIE, D. Use of SEP-PAK C₁₈ cartridges to clean up free amino acids from coniferous needles. *J. Chromatogr. A*, v. 690, n. 2, p. 226-229, 1995.
- KIRSCHBAUM, J.; REBSCHER, K.; BRÜCKNER, H. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fermented foods after derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride. *J. Chromatogr. A*, v. 881, p. 517-530, 2000.
- KOMPRDA, T.; NEZNALOVÁ, J.; STANDARA, S.; BOVER-CID, S. Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage. *Meat Sci.*, v. 59, p. 267-276, 2001.
- KRAUSE, I.; BOCKHARDT, A.; NECKERMANN, H.; HENLE, T.; KLOSTERMEYER, H. Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. *J. Chromatogr. A*, v. 715, p. 67-79, 1995.
- KRÍZEK, M.; PELIKÁNOVÁ, T. Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 815, p. 243-250, 1998.

- KUDO, K.; KIYOSHIMA, A.; OHTSUKA, Y.; IKEDA, N. Simultaneous determination of bromvalerylurea and allylisopropylacetylurea in human blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, v. 791, p. 171-177, 2003.
- KVASNICKA, F.; VOLDRICH, M. Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *J. Chromatogr. A*, v. 1103, p. 145-149, 2006.
- LANGE, J.; THOMAS, K.; WITTMANN, C. Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *J. Chromatogr. B*, v. 779, p. 229-239, 2002.
- LAPA-GUIMARÃES, J.; PICKOVA, J. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *J. Chromatogr. A*, v. 1045, p. 223-232, 2004.
- LE-BOUCHER, J.; CHARRET, C.; COUDRAY-LUCAS, C.; GIBOUDEAU, J.; CYNOBER, L. Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A. *Clin. Chem.*, v. 43, n. 8, p. 1421-1428, 1997.
- LERKE, P.A.; BELL, L.D. A rapid fluorometric method for the determination of histamine in canned tuna. *J. Food Sci.*, v. 41, p. 1282-1284, 1976.
- LIDE, D.R. (Ed.) *CRC handbook of chemistry and physics: a ready - reference book of chemical and physical data*. 76. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995 1V.
- LIMA, A.S. *Metodologia para a determinação de histamina por cromatografia de par iônico*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 1999. 76 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos)
- LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. *Bol. SBCTA*, v. 33, n.1, p. 70-79, 1999.
- LIU, X.; WANG, H.; LIANG, S.C.; ZHANG, H.S. Determination of primary and secondary aliphatic amines by *N*-hidroxysuccinimidyl 4,3,2'-naphthapyrone-4-acetate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, v. 441, p. 45-52, 2001.
- LOUKO, Z.; ZOTOU, A. Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection and characterization of the dansylation amines by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 996, p. 103-113, 2003.
- LOWE, D.R.; MARCH, C.; JAMES, J.E.; KARNES, T. A high performance liquid chromatographic method for histamine in plasma using solid phase extraction and fluorescamine derivatization. *J. Liquid Chromatogr.*, v. 17, n. 16, p. 3563-3570, 1994.
- LOZANOV, V.; PETROV, S.; MITEV, V. Simultaneous analysis of amino acid and biogenic polyamines by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization

- with *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide. *J. Chromatogr. A*, v. 1025, p. 201-208, 2004.
- LUKTON, A.; OLCOTT, H.S. Content of free imidazole compounds in the muscle tissue of aquatic animals. In *18th Annual Meeting of the Institute of Food Technologists*. Chicago, p. 611-618, 1958.
- MAH, J.H.; HAN, H.K.; OH, Y.J.; KIM, M.G.; HWANG, H.J. Biogenic amines in Jeotkals, Korean salted and fermented fish products. *Food Chem.*, v. 79, p. 239-243, 2002.
- MAHER, J.P.; WORTH, J.A.; ARVAY, J.; RAUM, K.; LAMPETRO, L.; WELTE, J.R. Scombroid fish poisoning - Pennsylvania, 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 49, n. 18, p. 398-400, 2000.
- MARCOBAL, A.; POLO, M.C.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; MORENO-ARRIBAS, M.V. Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Res. Int.*, v. 38, p. 387-394, 2005.
- MARINO, M.; MAIFRENI, M.; MORET, S.; RONDININI, G. The capacity of *Enterobacteriaceae* species to produce biogenic amines in cheese. *Letters Applied Microbiol.*, v. 31, p. 169-173, 2000.
- MARKS, H.S.; ANDERSON, C.R. Determination of putrescine and cadaverine in seafood (finfish and shellfish) by liquid chromatography using pyrene excimer fluorescence. *J. Chromatogr. A*, v. 1094, p. 60-69, 2005.
- MARLEY, E.; BLACKWELL, B. Interactions of monoamine oxidase inhibitors, amines, and foodstuffs. *Adv. Pharmacol. Chemother.*, v. 8, p. 185-239, 1970.
- MARTUSCELLI, M.; GARDINI, F.; TORRIANI, S.; MASTROCOLA, D.; SERIO, A.; CHAVES-LÓPEZ, C.; SCHIRONE, M.; SUZZI, G. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *Inter. Dairy J.*, v. 15, p. 571-578, 2005.
- McCABE, B.J. Dietary tyramine and other pressor amines in MAOI regimens: a review. *J. Am. Diet. Assoc.*, v. 86, n. 8, p. 1059-1064, 1986.
- MECK, J.V.; MARTIN, D.S.; S'AUNNO, D.S.; WATERS, W.W. Pressor response to intravenous tyramine is a marker of cardiac, but not vascular, adrenergic function. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 41, p. 126-131, 2003.
- MEDINA, M.A.; URDIALES, C.R.; RODRÍGUEZ-CASO, C.; RAMÍREZ, F.J.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.*, v. 38, n. 1, p. 23-59, 2003.

- MIETZ, L.J.; KARMAS, E. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition. *J. AOAC*, v. 61, n. 1, p. 139-145, 1978.
- MILLICHAP, J.G.; YEE, M.M. The diet factor in pediatric and adolescent migraine. *Pediatr. Neurol.*, v. 28, p. 9-15, 2003.
- MINOCHA, R.; LONG, S. Simultaneous separation and quantitation of amino acids and polyamines of forest tree tissues and cell cultures within a single high-performance liquid chromatography run using dansyl derivatization. *J. Chromatogr. A*, v. 1035, p. 63-73, 2004.
- mo DUGO, G.; VILASE, F.; LA TORRE, G.L.; PELLICANÒ, T.M. Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines. *Food Chem.*, v. 95, p. 672-676, 2006.
- MOLINS-LEGUA, C.; CAMPINS-FALCÓ, P. Solid phase extraction of amines. *Anal. Chim. Acta*, v. 546, p. 206-220, 2005.
- MORET, S.; CONTE, L.S. High performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods: an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *J. Chromatogr. A*, v. 729, p. 363-369, 1996.
- MORET, S.; CONTE, L.S.; SPOTO, E. Presenza delle amine biogene nei formaggi: fattori che ne influenzano le determinazioni analitiche. *Ind. Alim.*, v. 35, n. 350, 1996.
- NAGUIB, K.; AYESH, M.A.; SHALABY, R.A. Studies on the determination of biogenic amines in foods. 1. Development of a TLC method for the determination of eight biogenic amines in fish. *J. Agric. Food Chem.*, v. 43, p. 134-139, 1995.
- NAKAMURA, M.; WADA, Y.; SAWAYA, H.; KAWABATA, T. Polyamine content in fresh and processed pork. *J. Food Sci.*, v. 44, n. 2, p. 515-517, 523, 1979.
- NISHIDA, M.; NAMERA, A.; YASHIKI, M.; KOJIMA, T. Routine analysis of amphetamine and methamphetamine in biological materials by gas chromatography-mass spectrometry and on-column derivatization. *J. Chromatogr. B*, v. 789, p. 65-71, 2003.
- NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, n. 11, p. 5117-5123, 2000.
- NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; ROIG-SAGUÉS, A.X.; TRUJILLO-MESA, A.J.; VIDAL-CAROU, M.C. Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *J. Dairy Res.*, v. 71, p. 245-252, 2004.
- OHNUMA, S.; HIGA, M.; HAMANAKA, S.; MATSUSHIMA, K.; YAMAMURO, W. An Outbreak of allergy-like food poisoning. *Internal Medicine*, v. 40, p. 833-835, 2001.
- ÖNER, Z.; SAGDIÇ, O.; SIMSEK, B. Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of Turkish tulum cheeses. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 219, p. 455-459, 2004.

- ÖNER, Z.; KARAHAN, A.G.; ALOGLU, H. Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening. *Lebensm. Wirt. Technol.*, v. 39, p. 449-459, 2006.
- ÖZOGUL, F. Production of biogenic amines by *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Hafnia alvei* using a rapid HPLC method. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 219, p. 465-469, 2004.
- PALEOLOGOS, E.K.; CHYTIRY, S.D.; SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMINAS, M.G. Determination of biogenic amines as their benzoyl derivatives after cloud point extraction with micellar liquid chromatographic separation. *J. Chromatogr. A*, v. 1010, p. 217-224, 2003.
- PANASIUK, R.; AMAROWICZ, R.; KOSTYRA, H.; SIJTSMA, L. Determination of α -amino nitrogen in pea protein hydrolysates: a comparison of three analytical methods. *Food Chem.*, v. 62, n. 3, p. 363-367, 1998.
- PASTORE, P.; FAVARO, G.; BADOCCO, D.; TAPPARO, A.; CAVALLI, S.; SACCANI, G. Determination of biogenic amines in chocolate by ion chromatographic separation and pulsed integrated amperometric detection with implemented wave-form at Au disposable electrode. *J. Chromatogr. A*, v. 1098, p. 111-115, 2005.
- PATANGE, S.B.; MUKUNDAN, M.K.; KUMAR, K.A. A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. *Food Chem.*, v. 16, p. 465-472, 2005.
- PATTONO, D.; BOTTERO, M.T.; CIVERA, T.; GRASSI, M.A.; TURI, R.M. Presenza di amine biogene nei formaggi fusi e grattugiati. *Ind. Alimentari*, v. 39, n. 398, p. 1403-1410, 2000.
- PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; MELEGARI, M.; FIRENZUOLI, F. Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium* L. var. *amara* by LC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 29, p. 1113-1119, 2002.
- PETROVSKAIA, O.; TAYLOR, B.M.; HAUZE, D.B.; CARROLL, P.J.; JOULLIÉ, M.M. Investigations of the reaction mechanisms of 1,2-indanediones with amino acids. *J. Org. Chem.*, v. 66, p. 7666-7675, 2001.
- PIMENTEL, E.F. *Qualidade físico-química e microbiológica, presença de enterotoxinas estafilocócicas e aminas bioativas em queijo ralado*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 94 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos)
- PIMENTEL, E.F.; DIAS, R.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas biogênicas como critério de qualidade de queijo ralado. *Ind. Laticínios*, v. 6, n. 34, p. 69-70, 2001.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14. ed. Piracicaba: Degaspari, 2000. 477 p.

- PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; MENDES, E.; OLIVEIRA, B.M.; FERREIRA, M. Effect of temperature on evolution of free amino acids and biogenic amines contents during storage of Azeitão cheese. *Food Chem.*, v. 75, p. 287-291, 2001.
- PISANO, J.J.; OATES, J.A.; KARMEN, A.; SJOERDSMA, A.; UDENFRIED, S. Identification of p-hydroxy- α -(methylaminomethyl)benzyl alcohol (synephrine) in human urine. *J. Biol. Chem.*, v. 236, n. 3, p. 898-901, 1961.
- POLLACK, P.F.; KOLDOVSKY, O.; NISHIOKA, K. Polyamines in human and rat milk and in infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 56, p. 371-375, 1992.
- PUIG-DEU, M.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S.; TORRE-BORONAT, M.C. Quality of base and sparkling wines as influenced by the type of fining agent added pre-fermentation. *Food Chem.*, v. 66, n. 1, p. 35-42, 1999.
- REUVERS, T.B.A.; POZUELO, M.M.; RAMOS, M.; JIMENEZ, R. A rapid ion-pair HPLC procedure for the determination of tyramine in dairy products. *J. Food Sci.*, v. 51, n. 1, p. 84-86, 1986.
- REY, M.; POHL, C. Novel cation-exchange column for the separation of hydrophobic and/or polyvalent amines. *J. Chromatogr. A*, v. 997, p. 199-206, 2003.
- RIVAS-GONZALO, J.C.; GARCIA-MORENO, C.; GOMEZ-CERRO, M.A.; MARINE-FONT, A. Tiramina en alimentos. *Alimentaria*, v. 15, n. 91, p. 17-25, 1978.
- ROIG-SAGUÉS, A.X.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.M.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J.J.; QUINTO-FERNÁNDEZ, E.J.; MORA-VNTURA, M.T. Aminas biogenas en queso: riesgo toxicológico y factores que influyen en su formación. *Alimentaria*, v. 294, p.59-66, 1998.
- ROIG-SAGUÉS, A.X.; MOLINA, A.P.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.M. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 215, p. 96-100, 2002.
- ROMERO, R.; GÁZQUEZ, D.; BAGUR, M.G.; SÁNCHEZ-VIÑAS, M. Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 871, p. 75-83, 2000.
- SACCANI, G.; TANZI, E.; PASTORE, P.; CAVALLI, S.; REY, M. Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by suppressed ion chromatography-mass spectrometry using a cation-exchange column. *J. Chromatogr. A*, v. 1082, p. 43-50, 2005.
- SADAIN, S.K.; KOROPCHAK, J.A. Condensation nucleation light scattering detection for biogenic amines separated by ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 844, n. 1/2, p. 111-118, 1999.
- 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.

- SANTOS, W.C.; SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chem.*, v. 81, p. 595-606, 2003.
- SANTOS, F.J.; BARCELÓ-BARRACHINA, E.; TORIBIO, F.; PUIGNOU, L.; GALCERAN, M.T.; PERSSON, E.; SKOG, K.; MESSNER, C.; MURKOVIC, M.; NABINGER, U.; RISTIC, A. Analysis of heterocyclic amines in food products: interlaboratory studies. *J. Chromatogr. B*, v. 802, p. 69-78, 2004.
- SATO, H.; SAKAMURA, S.; OBATA, Y. The isolation and characterization of N-methyltyramine, tyramine and hordenine from sawa millet seeds. *Agr. Biol. Chem.*, v. 34, n. 8, p. 1254-1255, 1970.
- SATO, T.; HORIUCHI, T.; NISHIMURA, I. Simple and rapid determination of histamine in food using a new histamine dehydrogenase from *Rhizobium* sp. *Anal. Biochem.*, v. 346, p. 320-326, 2005.
- SEILER, N. Use of the dansyl reaction in biochemical analysis. In: GLICK, D. (Ed.) *Methods of biochemical analysis*. Nova York: Wiley, 1970. v. 18, p. 259-337.
- SEILER, N. Polyamines. *J. Chromatogr.*, v. 379, p. 157-176, 1986.
- SEN, N.P. Analysis and significance of tyramine in foods. *J. Food Sci.*, v. 34, p. 22-26, 1969.
- SERRAR, D.; BREBANT, R.; BRUNEAU, S.; DENOYEL, G.A. The development of a monoclonal antibody-based ELISA for the determination of histamine in food: application to fishery products and comparison with the HPLC assay. *Food Chem.*, v. 54, p. 85-91, 1995.
- SHAHANI, K.M.; HATHAWAY, I.L.; KELLY, P.I. B-complex vitamin content of cheese. II. Niacin, pantothenic acid, pyridoxine, biotin and folic acid. *J. Dairy Sci.*, v. 45, p. 833-836, 1962.
- SHAKILA, R.J.; VASUNDHARA, T.S.; KUMUDAVALLY, K.V. A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chem.*, v. 75, p. 255-259, 2001.
- SHALABY, A.R. Separation, identification and estimation of biogenic amines in foods by thin-layer chromatography. *Food Chem.*, v. 49, n. 3, p. 305-310, 1994.
- SHALABY, A.R. Multidetected, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chem.*, v. 52, p. 367-372, 1995.
- SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.*, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.
- SHALABY, A.R. Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for determining biogenic amines in foods. *Food Chem.*, v. 65, p. 117-121, 1999.
- SHALABY, A.R. Changes in biogenic amines in mature and germinating legume seeds and their behavior during cooking. *Nahrung*, v. 44, n. 1, p. 23-27, 2000.

- SHORE, P.A.; BURKHALTER, A.; COHN, V.H. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharm. Exp. Ther.*, v. 127, p. 182-186, 1959.
- SILLA-SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 29, n. 2/3, p. 213-231, 1996.
- SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W.H.; HALÁSZ, A. Biogenic amine content and microbial contamination of leafy vegetables during storage at 5°C. *J. Food Biochem.*, v. 17, p. 407-418, 1994.
- SIMON-SARKADI, L.; BARÁTH, A.; HODOSI, E. Determination of biogenic amines in cheese. In *9th World Congress of Food Science and Technology*. IUFOST, Budapest, p. 124, 1995.
- SIMON-SARKADI, L.; HODOSI, E. Determination of biogenic amines in food using amino acid analyser. *J. Euro Food Chem.*, VIII, p. 486-489, 1995.
- SOLOMONS, T.W.G. *Organic chemistry*. 6. ed. New York: John Wiley, 1996. 1218 p.
- STANDARA, S.; VESELÁ, M.; DRDÁK, M. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Nahrung*, v. 44, n. 1, p. 28-31, 2000.
- STARCHER, B. A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. *Anal. Biochem.*, v. 292, p. 125-129, 2001.
- STARUSZKIEWICZ Jr., W.F.; WALDRON, E.M.; BOND, J.F. Fluorometric determination of histamine in tuna: development of method. *J. AOAC*, v. 60, n. 5, p. 1125-1130, 1977.
- STRATTON, J.E.; HUTKINS, R.W.; TAYLOR, S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J. Food Protect.*, v. 54, n. 6, p. 460-470, 1991a.
- STRATTON, J.E.; HUTKINS, R.W.; TAYLOR, S.L. Histamine production in low-salt Cheddar cheese. *J. Food Protect.*, v. 54, n. 11, p. 852-855, 867, 1991b.
- TABOR, C.W.; TABOR, H. Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 53, p. 749-790, 1984.
- TAMIM, N.M.; BENNETT, L.W.; SHELLEM, T.A.; DOERR, J.A. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in poultry carcasses. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 5012-5015, 2002.
- TAVARES-NETO, J.; VIEIRA, S.M.; GLÓRIA, M.B.A. Purificação de amostras de suco de laranja por partição líquido-líquido e por extração em fase sólida para análise de aminas. In: *Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, 5, 2003, Campinas. Resumos...Campinas: UNICAMP, 2003 (CD).
- TAYLOR, S.L. *Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods*. Geneva: World Health Organization, p. 1-45, 1985.
- TAYLOR, S.L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit. Rev. Toxicol.*, v. 17, p. 91-128, 1986.

- TAYLOR, S.L.; LIEBER, E.R.; LEATHERWOOD, M. A simplified method for histamine analysis of foods. *J. Food Sci.*, v. 43, n. 1, p. 247-250, 1978.
- TAYLOR, S.L.; HUI, J.Y.; LYONS, D.E. Toxicology of scombroid poisoning. In: RAGELIS, E.P. (Ed.) *Seafood toxins*. Washington DC: ACS Symposium Series 262, 1984. p. 417-430.
- THAM, W. Histamine formation by *enterococci* isolated from home-made goat cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 7, p. 103-108, 1988.
- TIL, H.P.; FALKE, H.E.; PRINSEN, M.K.; WILLEMS, M.I. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food Chem. Toxicol.*, v. 35, p. 337-348, 1997.
- TOLEDO, M.C.F.; REYES, F.G.R. Nitratos e nitritos: presença em alimentos e riscos de sua ingestão. *R. Nutr. PUCCAMP*, v. 3, n. 1, p. 21-41, 1990.
- TSAI, Y.H.; KUNG, H.F.; LEE, T.M.; CHEN, H.C.; CHOU, S.S.; WEI, C.I.; HWANG, D.F. Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning. *Food Control*, v. 16, p. 579-585, 2005a.
- TSAI, Y.H.; KUNG, H.F.; LIN, Q.L.; HWANG, J.H.; CHENG, S.H.; WEI, C.I.; HWANG, D.F. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in kimchi products in Taiwan. *Food Chem.*, v. 90, p. 635-641, 2005b.
- ULLA, M.C.; VIDAL, M.C.; MARINÉ, A. Tiramina y tirosina durante la vinificación. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, v. 29, n. 2, p. 221-229, 1989.
- VALE, S.; GLÓRIA, M.B.A. Biogenic amines in Brazilian cheeses. *Food Chem.*, v. 63, n. 3, p. 343-348, 1998.
- VALE, S.; GLÓRIA, M.B.A. Determination of biogenic amines in cheese. *J. AOAC Int.*, v. 80, n. 5, p. 1006-1012, 1997.
- VALLETRISCO, M.; AZZI, A.; CLEMENTE, I.M. Relationship between the amount of biogenic amines and the state of deterioration in Erborinati cheeses. *Industria Alimentari*, v. 28, n. 276, p. 1084-1086, 1989.
- VALSAMAKI, K.; MICHAELIDOU, A.; POLYCHRONIADOU, A. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chem.*, v. 71, p. 259-266, 2000.
- van-HAASTER, C.M.C.J.; ENGELS, W.; LEMMENS, P.J.M.R.; HORNSTRA, G.; van-der-VUSSE, G.J. Rapid and highly sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of histamine and 3-methylhistamine in biological samples using fluorecamine as the derivatizing agent. *J. Chromatogr.*, v. 617, p. 233-240, 1993.
- VASUNDHARA, T.S.; KUMUDAVALLY, K.V.; JAYATHILAKAN, K.; JEYASHAKILA, R. HPLC analysis of the biogenic amines in some processed foods of Indian origin. *J. Food Sci. Technol.*, v. 35, n. 6, p. 551-556, 1998.

- VIEITES, J.M.; CASTRO, S.; RODRIGUEZ, M. Methods for determination of biogenic amines in fish and fish products using HPLC. *Alimentaria*, v. 279, p. 55-63, 1997.
- VINCE, G.; ANTONELLI, M.L. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. *Food Control*, v. 13, p. 519-524, 2002.
- VOGEL, A.H. *Vogel's textbook of practical organic chemistry*. 5. ed. New York: Longmann, 1989. 1514 p.
- VOIGT, M.N.; EITENMILLER, R.R.; KOEHLER, P.E. tyramine, histamine, and tryptamine content of cheese. *J. Milk Food Technol.*, v. 37, n. 7, p. 377-381, 1974.
- VWR International. Extrelut NT application guide. Disponível em: <<http://www.url.http://chromatography.co.uk/TECHNIQS/Other/Extrelut1.htm>>. Acesso em: 07 maio 2005a.
- VWR International. Extrelut® / Extrelut® QE general instructions. Disponível em: <<http://www.url.http://chromatography.co.uk/TECHNIQS/Other/cnote1.htm>>. Acesso em: 07 maio 2005b.
- WALLACE, J.M.; FOX, P.F. Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: a review. *Food Chem.*, v. 62, n. 2, p. 217-224, 1998.
- WALTERS, M.J. Determination of histamine in fish by liquid chromatography with post-column reaction and fluorometric detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 67, n. 6, p. 1040-1043, 1984.
- WALTERS, D.R. Polyamines and plant disease. *Phytochem.*, v. 64, n.1, p. 97-107, 2003.
- WARZECHA, L.; JANOSZKA, B.; BLASZCZYK, B.; STRÓZYK, M.; BODZEK, D.; DOBOSZ, C. Determination of heterocyclic aromatic amines (Haa) content in samples of household-prepared meat dishes. *J. Chromatogr. B*, v. 802, p. 95-106, 2004.
- WHEATON, T.A.; STEWART, I. Quantitative analysis of phenolic amines using ion-exchange chromatography. *Anal. Biochem.*, v. 12, p. 585-592, 1965.
- WHEATON, T.A.; STEWART, I. The distribution of tyramine, n-methyltyramine, hordenine, octopamine, and synephrine in higher plants. *Lloydia*, v. 33, n.2, p. 244-254, 1970.
- WHITE, W.F.; COHEN, A.I.; RIPPEL, R.H.; STORY, J.C.; SCHALLY, A.V. Some hypothalamic polyamines that deplete pituitary follicle stimulating hormone. *Endocrinol.*, v. 82, p. 742-752, 1968.
- WHITE, J.A.; HART, R.J. Derivatization methods for liquid chromatographic separation of amino acids. In: NOLLET, L.M.L. (Ed.) *Food analysis by HPLC*. Nova York: Marcel Dekker, 1992. p. 53-115.
- WINDHOLZ, M. (Ed.) *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 10. ed. Rahway: Merck, 1996. 2066 p.

- WOOD, A.T.; HALL, M.R. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of catecholamines and indoleamines using a simple gradient solvent system and native fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, v. 744, p. 221-225, 2000.
- YAMAMOTO, S.; ITANO, H.; KATAOKA, H.; MAKITA, M. Gas-liquid chromatographic method for analysis of di- and polyamines in foods. *J. Agric. Food Chem.*, v. 30, p. 435-439, 1982.
- YASHIN, Ya.I.; YASHIN, A.Ya. Analysis of food products and beverages using high-performance liquid chromatography and ion chromatography with electrochemical detectors. *J. Anal. Chem.*, v. 59, n. 12, p. 1121-1127, 2004.
- YOU, J.; SUN, H.; LAO, W.; OU, Q. Fluorescence properties of carbazole-9-yl-acetyl chloride and its application for the simultaneous determination of amino acids and biogenic amines via liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*, v. 382, p. 51-65, 1999.
- ZHANG, L.Y.; SUN, M.X. Determination of histamine and histidine by capillary zone electrophoresis with pre-column naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, v. 1040, p. 133-140, 2004.
- ZEE, J.A.; SIMARD; R.E.; ROY, A. An modified automated ion-exchange method for the separation and quantitation of biogenic amines. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, v. 14, n. 1, p. 71-75, 1981.
- ZEE, J.A.; SIMARD; R.E.; L'HEUREUX, L. Evaluation of analytical methods for determination of biogenic amines in fresh and processed meat. *J. Food Protect.*, v. 46, n. 12, p. 1044-1049, 1983.
- ZEE, J.A.; SIMARD; R.E.; L'HEUREUX, L. An automated method for the composite analysis of biogenic amines in cheese. *Lebensm. Wiss. Technol.*, v. 18, n. 4, p. 245-248, 1985.

APÊNDICE A

Influência do pH e do solvente orgânico na recuperação de aminas bioativas na etapa de purificação de extratos de queijo parmesão ralado, após adição de 5,0 e 10,0 mg de padrão de amina por 100 g de amostra

	% Recuperação (%CV)																
	Acetato de etila				Butanol				Éter etílico				Clorofórmio				
	pH 13	pH 10	pH 9		pH 13	pH 10	pH 9		pH 13	pH 10	pH 9		pH 13	pH 10	pH 9		
Histamina																	
+ 5 mg/100 g	57,9 a,A 106	60,1 a,B 18	0,8 b,B 143	9,8 c,C 88	72,8 a,B 10	48,8 b,A 17	30,9 c,B 54	102,5 a,A 12	64,0 b,A 15	0,0 a,C 53	5,6 a,C	0,0 a,B					
+ 10 mg/100 g	44,2 a,A 128	49,1 a,B 11	7,5 b,B 22	25,2 b,B 54	55,8 a,B 9	56,1 a,A 16	c,BC 19	97,2 a,A 14	51,4 b,A 58	0,0 a,C 26	16,8 a,C	17,5 a,B 36					
Tiramina																	
+ 5 mg/100 g	16,2 a,B 56	3,0 b,C 30	0,0 b,C	27,7 c,A 94	140,2 a,A 11	44,6 b,A 15	19,1 b,B 67	84,5 a,B 3	18,7 b,B 17	5,9 a,C 87	1,8 a,C	0,0 a,C					
+ 10 mg/100 g	11,1 a,B 87	0,6 a,C 71	0,0 a,C	65,2 c,A 85	b,A 3	131,9 a,A 14	10,9 b,B 10	88,5 a,B 7	27,6 b,B 109	3,4 a,B 10	1,5 a,C	18,1 a,B 87					
Espermina																	
+ 5 mg/100 g	0,0 b,C 30	4,9 a,C 30	0,1 b,B 173	7,2 c,B 18	10,8 b,B 8	25,9 a,A 15	7,2 b,B 12	26,9 a,A 14	0,0 c,B	21,4 a,A 34	0,5 b,D 173	0,0 b,B					
+ 10 mg/100 g	0,0 ab,C 17	3,5 a,BC 17	0,8 b,B 96	12,6 b,B 70	5,8 a,B 11	10,6 a,A 14	2,2 b,C 45	10,1 a,A 6	2,4 b,B 104	17,5 a,A 16	0,1 b,C 173	0,0 b,B					
Espermicina																	
+ 5 mg/100 g	4,5 b,C 136	13,8 a,A 40	0,9 c,B 133	16,7 a,B 23	15,5 a,A 12	4,2 b,A 25	14,9 a,B 8	3,5 b,B 19	1,4 b,A 90	30,8 a,A 11	4,5 b,B 88	4,0 b,A 53					
+ 10 mg/100 g	2,9 a,D 2	1,6 a,B 60	0,9 a,B 105	23,3 a,B 23	9,5 b,A 23	11,8 b,A 37	16,4 a,C 22	2,8 b,B 32	1,6 b,B 10	35,1 a,A 12	4,0 b,B 22	2,0 b,B 54					

CV: coeficiente de variação. Valores com letras minúsculas diferentes (a-c) apresentam diferença significativa entre pH; valores com letras maiúsculas diferentes (A-D)

apresentam diferença significativa entre os solventes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$).

Continuação

	% Recuperação (%CV)															
	Acetato de etila				Butanol				Éter etílico				Clorofórmio			
	pH 13	pH 10	pH 9		pH 13	pH 10	pH 9		pH 13	pH 10	pH 9		pH 13	pH 10	pH 9	
Agmatina																
+ 5 mg/100 g	0,0 a,C	0,0 a,B	0,0 a,A	4,2 b,B	33,9 a,A	0,0 c,A	0,0 a,C	0,0 a,B	0,0 a,A	0,0 a,A	10,3 a,A	0,0 b,B	0,0 b,A	0,0 b,A	108	
+ 10 mg/100 g	0,0 a,B	0,0 a,B	0,0 a,A	41,0 a,A	25,0 b,A	0,0 c,A	0,0 a,B	0,0 a,B	0,0 a,A	0,0 a,A	0,0 a,B	0,0 a,B	0,0 a,B	0,0 a,B	0,0 a,A	
				76	11											
Putrescina																
+ 5 mg/100 g	3,3 a,C	0,0 a,B	0,0 a,A	12,5 b,B	20,2 a,A	0,0 c,A	34,5 a,A	2,7 b,B	0,0 b,A	0,0 b,A	29,5 a,A	0,0 b,B	0,0 b,A	0,0 b,A	41	
	51			25	33		50	79								
+ 10 mg/100 g	3,8 a,C	0,0 a,B	0,0 a,A	a,AB	9,9 b,A	3,9 b,A	35,6 a,B	0,7 b,B	0,0 b,A	0,0 b,A	45,7 a,A	0,0 b,B	0,0 b,A	0,0 b,A	10	
	53			61	83	25	31	65								
Cadaverina																
+ 5 mg/100 g	9,8 a,C	0,0 a,C	0,0 a,A	16,0 b,C	51,1 a,A	2,6 c,A	49,0 a,A	14,2 b,B	0,0 c,A	0,0 c,A	32,1 a,B	0,0 b,C	0,0 b,A	0,0 b,A	127	
	74			10	5	44	23	24								
+ 10 mg/100 g	12,1 a,C	0,0 b,B	0,0 b,B	70,9 a,A	28,6 b,A	14,5 b,A	55,8 a,B	2,6 b,B	0,0 b,B	0,0 b,B	79,6 a,A	0,0 b,B	3,7 b,AB	0,0 b,B	13	
	88			70	27	16	12	57								
Feniletilamina																
+ 5 mg/100 g	84,6 a,B	55,1 b,A	28,4 c,C	3,5 a,D	17,4 a,B	11,4 a,D	48,7 a,C	60,9 a,A	52,6 a,B	124,9 a,A	61,0 b,A	114,0 a,A	114,0 a,A	114,0 a,A	15	
	13	8	24	115	10	25	2	17	11	6	15	50	50	50		
+ 10 mg/100 g	86,0 a,B	55,3 b,B	39,5 c,C	17,3 a,D	18,2 a,C	16,3 a,D	53,3 a,C	a,AB	60,7 a,B	154,7 a,A	69,8 b,A	147,4 a,A	147,4 a,A	147,4 a,A	16	
	23	15	13	41	15	14	7	9	10	5	16	21	21	21		
Triptamina																
+ 5 mg/100 g	47,5 a,B	42,1 a,B	16,5 b,B	9,9 a,C	0,0 a,D	0,0 a,C	0,0 c,C	25,2 b,C	57,3 a,A	138,6 a,A	90,6 b,A	62,6 c,A	62,6 c,A	62,6 c,A	4	
	23	5	44	109			5	5	13	19	4	94	94	94		
+ 10 mg/100 g	51,8 a,B	48,1 a,B	22,7 b,C	8,4 a,C	0,0 a,D	5,2 a,D	6,1 c,C	28,1 b,C	60,0 a,B	104,6 a,A	83,1 b,A	92,7 b,A	92,7 b,A	92,7 b,A	6	
	27	14	24	90		7	173	2	10	8	6	34	34	34		

CV: coeficiente de variação. Valores com letras minúsculas diferentes (a-c) apresentam diferença significativa entre pH; valores com letras maiúsculas diferentes (A-D)

apresentam diferença significativa entre os solventes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$).

Continuação

	% Recuperação (%CV)											
	Acetato de etila			Butanol			Éter etílico			Clorofórmio		
	pH 13	pH 10	pH 9	pH 13	pH 10	pH 9	pH 13	pH 10	pH 9	pH 13	pH 10	pH 9
Serotonina												
+ 5 mg/100 g	33,6 a,A 27	32,1 a,A 27	0,0 b,B	0,0 b,B	19,1 a,B 10	0,0 b,B	0,0 b,B	0,0 b,B	20,0 a,A 11	0,0 a,B	0,0 a,C	0,0 a,B
+ 10 mg/100 g	29,0 a,A 40	25,4 a,A 5	0,0 a,B	11,7 b,B 21	20,2 a,B 26	0,0 c,B	0,0 b,C	0,0 b,C	45,4 a,A 13	0,0 a,C	0,0 a,C	0,0 a,B

CV: coeficiente de variação. Valores com letras minúsculas diferentes (a-c) apresentam diferença significativa entre pH; valores com letras maiúsculas diferentes (A-D) apresentam diferença significativa entre os solventes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$).

APÊNDICE B

Influência da concentração de bentonite na recuperação de aminos bioativas após purificação dos extratos ácidos de queijo Parmesão ralado adicionados de duas concentrações (5,0 e 10,0 mg/100 g) de aminos

	% de recuperação de aminos bioativas (%CV)			
	Concentração de bentonite (mg/mL de extrato)			
	1	10	50	100
Histamina				
+ 5 mg/100 g	0,0 b,y	6,5 b,y (96)	8,9 b,y (87)	31,7 a (66)
+ 10 mg/100 g	195,6 a,x (7)	34,5 b,x (40)	34,2 b,x (44)	40,0 b (12)
Tiramina				
+ 5 mg/100 g	100,3 y (8)	67,7 y (24)	56,6 y (51)	113,2 (62)
+ 10 mg/100 g	176,4 x (6)	185,8 x (7)	138,6 x (17)	150,8 (7)
Espermina				
+ 5 mg/100 g	0,0	0,0	0,0	0,0
+ 10 mg/100 g	0,0	0,0	0,0	0,0
Espermidina				
+ 5 mg/100 g	72,3 a,y (9)	9,1 b (33)	0,0 c	0,5 c (87)
+ 10 mg/100 g	106,4 a,x (5)	13,4 b (10)	1,2 c (46)	1,0 c (87)
Agmatina				
+ 5 mg/100 g	0,9 b,y (173)	0,0 b	0,0 b	16,7 a,x (25)
+ 10 mg/100 g	38,8 a,x (18)	0,0 c	0,0 c	10,3 b,y (18)
Putrescina				
+ 5 mg/100 g	182,2 a (1)	48,0 c,y (27)	31,7 c,y (8)	83,6 b (41)
+ 10 mg/100 g	193,7 a (1)	155,1 b,x (6)	76,9 d,x (17)	105,1 c (9)
Cadaverina				
+ 5 mg/100 g	64,2 ab,y (17)	14,2 bc,y (115)	35,3 c,y (89)	89,1 a (46)
+ 10 mg/100 g	214,6 a,x (7)	185,9 a,x (12)	80,5 b,x (35)	118,7 b (15)
Feniletilamina				
+ 5 mg/100 g	106,9 a,y (6)	91,4 a,y (6)	48,1 b,y (28)	60,3 b (19)
+ 10 mg/100 g	131,5 a,x (7)	117,4 a,x (6)	73,6 b,x (20)	75,2 b (2)
Triptamina				
+ 5 mg/100 g	37,7 a,y (21)	0,0 b,y	0,0 b	0,0 b
+ 10 mg/100 g	84,3 a,x (7)	16,3 b,x (60)	0,0 c	0,0 c
Serotonina				
+ 5 mg/100 g	27,2 a,y (27)	1,3 b (137)	0,0 b	0,0 b
+ 10 mg/100 g	102,7 a,x (10)	0,0 b	0,0 b	0,0 b

CV: coeficiente de variação. Valores com letras diferentes para cada linha (a-d) ou coluna (x-y) são significativamente diferentes (Teste de Duncan, $p \leq 0,05$).