

LETÍCIA ROCHA GUIDI

**AMINAS BIOATIVAS EM MOLHO DE SOJA:
VALIDAÇÃO DE MÉTODO E OCORRÊNCIA**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010**

LETÍCIA ROCHA GUIDI

**AMINAS BIOATIVAS EM MOLHO DE SOJA:
VALIDAÇÃO DE MÉTODO E OCORRÊNCIA**

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

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

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA

LETÍCIA ROCHA GUIDI

“AMINAS BIOATIVAS EM MOLHO DE SOJA: VALIDAÇÃO DE MÉTODO E OCORRÊNCIA”

APROVADA EM 19 DE ABRIL DE 2010

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. DAVID LEE NELSON

Profa. Dra. FLÁVIA BEATRIZ CUSTÓDIO

Profa. Dra. JOSIANNE NICÁCIO SILVEIRA

Profa. Dra. MARIA BEATRIZ ABREU GLÓRIA
Orientadora

Dedico este trabalho aos meus pais, Ricardo e Heloisa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde e por sempre guiar os meus caminhos.

Aos meus pais, Ricardo e Heloisa, pelo amor, exemplo e suporte.

Às minhas irmãs, Clarissa e Cláudia, pelo carinho e amizade.

Ao Alípio, pelo apoio e carinho.

Aos meus amigos e familiares pela amizade.

À Professora Dr^a. Maria Beatriz Abreu Glória, pelas oportunidades, pelo exemplo e orientação, durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do LBqA, Kátia, Priscila, Juliana, Warley, Adriana, Cecília, Patrícia, Guilherme, Tarliane, Bruno, Sílvia, Renata, Tânia e às amigas de caminhada Marina, Lílian e Raquel, pelos bons momentos compartilhados, pela amizade e conselhos.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo aprendizado.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 MOLHO DE SOJA.....	15
2.1.1 Matérias primas.....	15
2.1.2 Produção do molho de soja fermentado.....	16
2.1.2.1 Produção do <i>Koji</i>	17
2.1.2.2 Fermentação em salmoura.....	19
2.1.2.3 Refino.....	20
2.1.3 Produção do molho de soja por hidrólise ácida.....	20
2.1.4 Composição química do molho de soja.....	20
2.2 AMINAS BIOATIVAS.....	22
2.2.1 Definição e classificação.....	22
2.2.2 Formação.....	25
2.2.3 Funções.....	27
2.2.4 Aspectos toxicológicos.....	29
2.2.5 Aminas como critério de qualidade.....	35
2.2.6 Aminas bioativas em soja.....	35
2.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS APLICADOS À ANÁLISE DE AMINAS BIOATIVAS EM MOLHO DE SOJA.....	35
2.3.1 Extração.....	36
2.3.2 Separação.....	37
2.3.3 Detecção.....	37
2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	39
2.4.1 Linearidade.....	40
2.4.2 Seletividade.....	41
2.4.3 Limite de detecção.....	42
2.4.4 Limite de quantificação.....	42
2.4.5 Faixa de aplicação.....	43
2.4.6 Exatidão.....	43
2.4.7 Precisão.....	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 MATERIAL.....	45
3.1.1 Amostras.....	45
3.1.2 Reagentes e solventes.....	45
3.1.3 Soluções.....	45
3.1.3.1 Solução padrão de dez aminas.....	46
3.1.3.2 Soluções padrão.....	46
3.1.3.3 Solução tampão acetato de sódio:octanosulfonato de sódio.....	46
3.1.3.4 Solução derivante.....	46
3.1.4 Vidraria.....	46

3.2	MÉTODOS.....	47
3.2.1	Otimização do método de extração de aminos bioativas em molho de soja	47
3.2.2	Validação do método de determinação de aminos bioativas em molho de soja	48
3.2.2.1	Linearidade.....	48
3.2.2.2	Seletividade e efeito da matriz.....	49
3.2.2.3	Exatidão, precisão e limites.....	50
3.2.3	Análise de aminos bioativas em molhos de soja coletados no mercado de Belo Horizonte/MG	51
3.2.4	Análises físico-químicas dos molhos de soja coletados no mercado de Belo Horizonte/MG	53
3.2.4.1	Determinação de pH e acidez	53
3.2.4.2	Determinação de sólidos solúveis (° Brix)	54
3.2.5	Correlação entre os teores de aminos bioativas em molho de soja com as características físico-químicas	54
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS EM MOLHO DE SOJA ..	55
4.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODÓ DE DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS EM MOLHO DE SOJA	63
4.2.1	Linearidade.....	63
4.2.2	Seletividade e efeito de matriz.....	66
4.2.3	Precisão e exatidão	70
4.2.4	Limites de quantificação e detecção.....	71
4.3	AMINAS BIOATIVAS EM MOLHOS DE SOJA COLETADOS NO MERCADO DE BELO HORIZONTE/MG	72
4.3.1	Perfil de aminos bioativas nas amostras analisadas	72
4.3.2	Teores de aminos bioativas nas amostras analisadas	73
4.4	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS MOLHOS DE SOJA COLETADOS NO MERCADO DE BELO HORIZONTE/MG	77
4.4.1	Determinação de pH, acidez e sólidos solúveis (°Brix)	77
4.4.2	Relação entre o teor de aminos bioativas em molho de soja com os diferentes tipos de fermentação e com as características físico-químicas.....	78
5	CONCLUSÕES.....	79
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE TABELAS

1	Composição do molho de soja, para cada 100 g de matéria seca.....	21
2	Composição de aminoácidos na soja, no trigo e no molho de soja.....	22
3	Funções metabólicas e fisiológicas das amins bioativas.....	28
4	Efeitos tóxicos das amins bioativas.....	34
5	Primeiro planejamento experimental para otimização da extração de amins putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja.....	47
6	Segundo planejamento experimental para otimização da extração de amins putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja.....	48
7	Ensaio extras para otimização da extração das amins putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja	48
8	Critérios de aceitabilidade do desvio padrão relativo (DPR) para cada nível de concentração.....	51
9	Gradiente de eluição para as fases móveis acetonitrila e solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio utilizado na determinação das amins.....	52
10	Matriz do primeiro planejamento experimental realizado para otimização da extração de amins putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja.....	56
11	Efeitos padronizados, desvios padrão, valores de t e probabilidade das variáveis independentes do primeiro planejamento fatorial para otimização da extração das amins putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja.....	57
12	Matriz do segundo planejamento experimental realizado para otimização da extração das amins putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja.....	60
13	Efeitos padronizados, desvios padrão, valores de t e probabilidade das variáveis independentes do segundo planejamento fatorial para otimização da extração das amins putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja.....	61
14	Porcentagem de recuperação na extração das amins putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja.....	62

LISTA DE TABELAS - CONTINUAÇÃO

15	Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para as curvas das aminas bioativas.....	64
16	Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para as curvas das aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina construídas em molho de soja.....	67
17	Comparação entre as interseções e inclinações das curvas de calibração na matriz molho de soja com as curvas no solvente para as aminas na faixa de 2,0 a 10,0 mg/L.....	70
18	Médias de recuperação aparente e desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de uva e vinho adicionadas de putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em diferentes níveis de concentração.....	71
19	Limites de detecção e de quantificação para as aminas estudadas na matriz molho de soja.....	72
20	Teores de aminas (mg/L) em molhos de soja adquiridos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG no período de julho de 2009 a fevereiro de 2010.....	74
21	Características físico-químicas das amostras de molhos de soja adquiridos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG no período de julho de 2009 a fevereiro de 2010.....	77
22	Correlação entre os teores de aminas e as características físico-químicas das amostras.....	78
23	Correlação entre os teores de aminas das amostras analisadas.....	78

LISTA DE FIGURAS

1	Fluxograma de produção do molho de soja.....	17
2	Vias metabólicas para formação de aminas bioativas.....	24
3	Estrutura química de algumas aminas bioativas.....	25
4	Formação de aminas por descarboxilação de aminoácido.....	25
5	Esquema da absorção das aminas biogênicas pelo intestino em condições normais e na ausência das enzimas oxidases.....	30
6	Metabolismo da histamina em humanos.....	32
7	Reação de o-ftalaldeído com aminas primárias na presença de mercaptoetanol.....	38
8	Sistema CLAE com derivação pós-coluna e detector de fluorescência utilizado na análise das aminas bioativas.....	53
9	Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas das aminas analisadas em solvente.....	63
10	Curvas de calibração das aminas em solvente, na faixa de 2,0 a 10,0 mg/L, com as respectivas equações e coeficientes de determinação.....	65
11	Cromatograma da solução padrão das dez aminas no solvente e adicionada à matriz molho de soja, na concentração de 10,0 mg/L.....	66
12	Curvas de calibração das aminas na matriz molho de soja, na faixa de 2,0 a 10,0 mg/L, com as respectivas equações e coeficientes de determinação.....	68
13	Curvas de calibração das aminas no solvente e na matriz molho de soja, na faixa de 2,0 a 10,0 mg/L.....	69
14	Percentual de ocorrência das dez aminas em amostras de molho de soja.....	73
15	Percentual de lotes, para cada marca, com teores de histamina, tiramina e feniletilamina acima dos valores considerados capazes de causar efeitos adversos à saúde.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGM	- Agmatina
CAD	- Cadaverina
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAO	- Diaminoxidases
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
DnsCl	- Cloreto de dansila
EPD	- Espermidina
EPM	- Espermina
FEM	- Feniletilamina
FMOC	- 9-Fuorenilmetil cloroformato
HIM	- Histamina
IAL	- Instituto Adolf Lutz
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	- <i>International Organization for Standardization</i>
LD	- Limite de detecção
LQ	- Limite de quantificação
MAO	- Monoaminoxidases
MMQO	- Método dos Mínimos Quadrados Ordinário
ND	- Não detectado
ODC	- Ornitina descarboxilase
OPA	- o-ftalaldeído
PAO	- Poliaminoxidases
PUT	- Putrescina
PVDF	- Fluoreto de polivinilideno
RNA	- Ácido Ribonucléico
SAM	- S-adenosilmetionina
SRT	- Serotonina
TCA	- Ácido tricloroacético
TIM	- Tiramina
TRM	- Triptamina
UV	- Ultra-violeta

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar o perfil e os teores de aminas bioativas em molhos de soja produzidos no Brasil e comercializados no mercado de Belo Horizonte/MG. Um método para a determinação de aminas bioativas por CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído (OPA) e detecção fluorimétrica foi validado. O método foi linear, preciso e exato para as aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina, que foram as aminas presentes em maior quantidade nas amostras estudadas. Os limites de detecção e quantificação foram adequados para a análise de aminas em molho de soja. Foi observado efeito da matriz na análise de algumas aminas. As condições ótimas para extração das aminas foram: 6 mL de amostra, 15 mL de TCA 5%, 4 minutos de agitação e centrifugação não foi requerida. As aminas encontradas em amostras do mercado foram: putrescina (97,6%), cadaverina (28,6%), histamina (78,6%), tiramina (100%) e feniletilamina (57,1%). Os teores totais de aminas variaram de 14,5 a 775,9 mg/L, sendo que a tiramina foi a amina que mais contribuiu ao teor total. As amostras das marcas B, D, E, F e G apresentaram mais que 60% dos lotes com teores de histamina e tiramina e mais que 30% dos lotes com teores de feniletilamina acima do limite sugerido, valores esses capazes de causar efeitos adversos à saúde. Os teores das aminas variaram de: putrescina – n.d. a 180,0 mg/L; cadaverina – n.d. a 68,6 mg/L; histamina – n.d. a 395,0 mg/L; tiramina - 3,0 a 659,9 mg/L; e feniletilamina – n.d. a 121,9 mg/L. O pH das amostras variou de 4,0 a 5,3; e a acidez entre 290,6 e 1312,9 meq/L. O teor de sólidos solúveis variou de 22 a 30 °Brix. A acidez correlacionou positivamente com todas as aminas, exceto com a cadaverina. A putrescina teve correlação positiva apenas com a feniletilamina. Existe correlação entre as aminas cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina.

PALAVRAS-CHAVE: molho de soja; aminas bioativas; qualidade; CLAE.

ABSTRACT

BIOACTIVE AMINES IN SOY SAUCE: METHOD VALIDATION AND OCCURRENCE.

The objective of this work was to determine the profile and levels of biogenic amines in Brazilian soy sauce from the retail market of Belo Horizonte/MG. An ion pair-HPLC method with post column derivatization with OPA and fluorimetric detection for the determination of biogenic amines in soy sauce was validated. The method was linear, precise and accurate for putrescine, cadaverine, histamine, tyramine and phenylethylamine, which are usually found at high levels in soy sauces. Detection and quantification limits were appropriate for the analysis. There was a significant effect of the matrix on the analysis. The optimum conditions for the extraction of amines were 6 mL of sample, 15 mL of TCA 5%, 4 minutes of agitation and no centrifugation was required. The amines found in the samples were: putrescine (97.6%), cadaverine (28.6%), histamine (78.6%), tyramine (100%) and phenylethylamine (57.1%). The total level of amines ranged from 14.52 to 775.94 mg/L. Tyramine contributed the most to total amine levels. Brands B, D, E, F and G had more than 60% of the samples with histamine and tyramine and more than 30% of the samples with phenylethylamine contents higher than the toxic limit suggested, values capable of causing adverse health effects. The concentrations of the biogenic amines were: putrescine – nd to 180.0 mg/L; cadaverine – nd to 68.6 mg/L; histamine – nd to 395.0 mg/L; tyramine – 3.0 to 659.9 mg/L; and phenylethylamine – nd to 121.9 mg/L. The pH of the samples ranged from 4.0 to 5.2; the acidity from 290.6 to 1312.9 meq/L and the soluble solids content ranged from 22 to 30 °Brix. There was a significant correlation between acidity and the putrescine, histamine, tyramine and phenylethylamine concentration. Putrescine presented a significant correlation only with phenylethylamine. There was a significant correlation among cadaverine, histamine, tyramine and phenylethylamine.

KEY WORDS: soy sauce; amines, quality; HPLC.

1 INTRODUÇÃO

Aminas bioativas são bases orgânicas de baixo peso molecular que possuem atividade biológica. Estas não representam perigo à saúde de indivíduos a menos que grandes quantidades sejam ingeridas ou quando o catabolismo das mesmas é inibido ou geneticamente deficiente. Além disso, algumas aminas podem reagir com nitrito formando N-nitrosaminas, que são compostos cancerígenos (WARTHESEN et al., 1975). Grandes quantidades de algumas aminas podem ser encontradas em alimentos como conseqüência do uso de matérias-primas de baixa qualidade, contaminação e condições inadequadas durante o processamento e armazenamento (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994). Altas concentrações de aminas biogênicas têm sido encontradas em alimentos fermentados como resultado da ação de microrganismos capazes de descarboxilar aminoácidos (SILLA-SANTOS, 1996). A deterioração de alimentos por microrganismos contaminantes pode ser acompanhada pelo aumento na produção de descarboxilases; desta forma, a presença de aminas biogênicas pode servir como um indicador de deterioração de alimentos. Por estas razões, é importante monitorar os teores de aminas biogênicas em alimentos, como no molho de soja.

O molho de soja é um líquido marrom escuro com sabor salgado, e um característico e agradável aroma de extratos de carne, usado como flavorizante em muitos países orientais tradicionais e, também, como substituto do sal. Este molho é fabricado a partir da fermentação da soja, com cereais (geralmente trigo, ou outro cereal amiláceo) e sal com uma mistura de bolores, leveduras e bactérias. A fermentação é essencialmente um processo de hidrólise enzimática de proteínas, carboidratos e outros constituintes da soja e trigo em peptídeos, aminoácidos, açúcares, alcoóis, amônia etc, por enzimas produzidas pelo *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus sojae* (WHITAKER, 1978). Devido aos teores relativamente altos de aminoácidos livres no molho de soja, o mesmo pode ser fonte potencial de aminas biogênicas. Na maioria dos alimentos ricos em proteínas e aminoácidos submetidos a fermentação ou a condições higiênico-sanitárias inadequadas e condições favoráveis ao crescimento microbiano, pode-se ter a formação de aminas biogênicas (SILLA-SANTOS, 1996). Entretanto, existem poucos dados disponíveis na literatura a respeito da ocorrência de aminas em molho de soja e das características físico-químicas dos mesmos. Os poucos dados existentes não são de produtos brasileiros. STUTE et al. (2002) avaliaram a presença de aminas em molhos de

soja comerciais importados adquiridos no mercado alemão. Concluíram que a tiramina é a amina presente em maior quantidade em molho de soja; YONGMEI et al. (2009) avaliaram molhos de soja chineses e BAEK et al. (1998) molhos japoneses.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo geral determinar o perfil e os teores de aminas bioativas em molhos de soja produzidos no Brasil e comercializados no mercado de Belo Horizonte, MG. Os objetivos específicos foram:

- (i) otimizar o método de extração de aminas bioativas em molho de soja;
- (ii) validar o método de acordo com parâmetros de desempenho de linearidade, seletividade, limite de quantificação e de detecção, exatidão e precisão;
- (iii) analisar amostras de molhos de soja comerciais coletadas no mercado de Belo Horizonte quanto ao perfil e teores de aminas bioativas;
- (iv) realizar algumas análises físico-químicas nos mesmos molhos de soja; e
- (v) correlacionar os teores de aminas bioativas com as características físico-químicas do molho de soja.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MOLHO DE SOJA

O molho de soja é um líquido marrom escuro obtido da fermentação de soja com trigo ou outro cereal ou amiláceo, de sabor salgado, com um característico e agradável aroma de extrato de carne. Este é usado como flavorizante em muitos países orientais tradicionais, como Japão, Coréia, Cingapura, China, Tailândia, Filipinas, Indonésia e Malásia, para substituir o sal. Além disso, reforça o sabor e a coloração de carnes, frutos do mar e vegetais. Os países orientais são os maiores produtores do molho de soja, sendo o Japão considerado o líder em termos de número de produtores, consumo do produto e utilização da mais avançada tecnologia (AQUARONE et al., 2001).

A tecnologia de fermentação do molho de soja, como de outras fermentações tradicionais, era primeiramente uma arte familiar guardada a sete chaves. Atualmente, os importantes passos não são mais segredos, mas os delicados e importantes pormenores são ainda informações confidenciais (AQUARONE et al., 2001).

O molho de soja é feito através da fermentação da soja, cereais (geralmente trigo) e sal com uma mistura de fungos, leveduras e bactérias. Durante a fermentação, ocorre, essencialmente, a hidrólise enzimática de proteínas, carboidratos e outros constituintes da soja e trigo, com formação de peptídeos, aminoácidos, açúcares, alcoóis etc.

Inicialmente, o purê de soja era fermentado a temperatura ambiente por 1 a 3 anos. Depois, vários lotes de molho, que tinham sido fermentados por períodos diferentes, eram misturados e vendidos. Foram feitas diversas tentativas para reduzir o longo período de fermentação e, desta forma, baixar o custo de produção. Nos últimos tempos houve uma tendência crescente de fazer o molho de soja por hidrólise ácida, a fim de elevar a sua produção e reduzir o tempo de preparação. Mesmo onde o método de fermentação ainda é usado, hidrolisados de soja são acrescentados ao produto fermentado como intensificadores de sabor (AQUARONE et al., 2001).

2.1.1 Matérias primas

São utilizados na produção grãos de soja, trigo, água e sal (HESSELTINE, 1977; STEINKRANS, 1989). Tradicionalmente, o molho de soja é produzido a partir de grãos de soja integrais. Entretanto, atualmente, a soja desengordurada tem sido utilizada com

maior frequência. A razão reside nos seguintes fatores: a soja desengordurada apresenta um custo menor, a utilização de nitrogênio é mais alta e o alto teor de umidade da soja desengordurada umedecida pode ser benéfico para a cultura de bolores. A proteína dos grãos de soja crus não pode ser hidrolisada pelas proteases no *Koji*, portanto, é necessário desnaturar a proteína para que possa ser digerida por estas enzimas. Para isso, os grãos de soja são geralmente mergulhados em água da noite para o dia, escorridos e cozidos a vapor por várias horas (AQUARONE et al., 2001).

O trigo funciona como fonte de carboidrato para os bolores e atua na fermentação do purê. O trigo é torrado e levemente esmagado, sendo que o processo de torrefação confere sabor e coloração ao molho de soja resultante, destrói microrganismos da superfície e facilita a hidrólise enzimática. A mistura de trigo durante a fermentação tem diversos objetivos:

a) os fungos crescem melhor e produzem mais enzimas em uma mistura de trigo e soja do que em trigo e em soja separadamente;

b) o trigo serve como precursor de açúcares, alcoóis, ácidos orgânicos e componentes do sabor; e

c) o trigo é rico em ácido glutâmico, normalmente adicionado para intensificar o sabor do produto.

Apesar de ser normalmente utilizado o trigo, alguns fabricantes optam por substituí-lo pelo milho e, assim, aproximam mais o sabor do molho *shoyu* ao gosto brasileiro (SBRT, 2010).

O sal utilizado no processo de fabricação do molho, geralmente é o cloreto de sódio comercial. Além de conferir sabor salgado, atua como um conservante e tem uma ação seletiva nos microrganismos que crescem no substrato da fermentação. Recomenda-se a utilização de água com baixos teores de ferro e cobre, pois estes metais reduzem a estabilidade da coloração no produto final (AQUARONE et al., 2001).

2.1.2 Produção do molho de soja fermentado

O processo de produção do molho de soja fermentado pode ser dividido em três passos maiores denominados: produção do *Koji*, fermentação em salmoura, e refino (LUH, 1995). Um fluxograma de produção é apresentado na Figura 1.

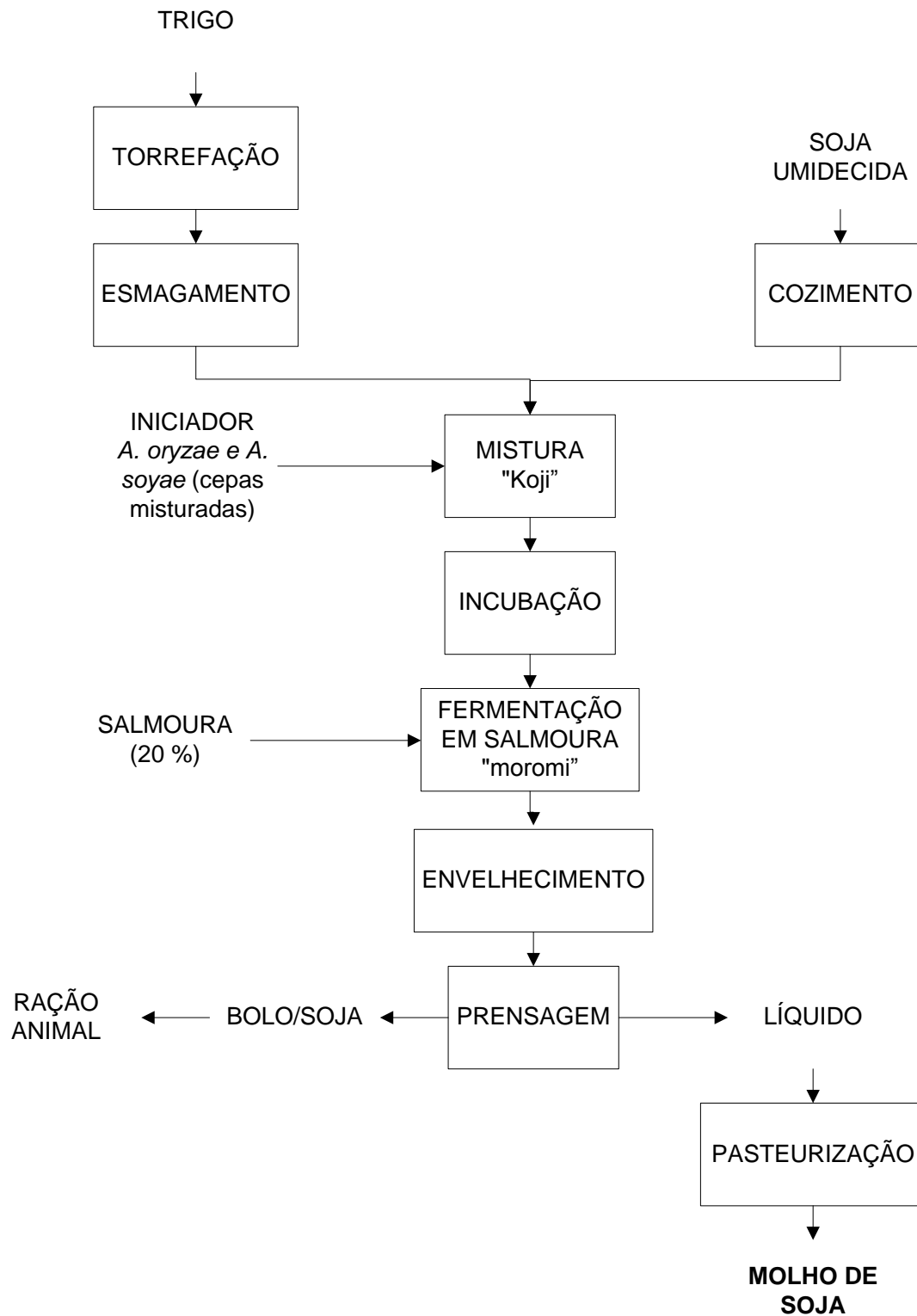


Figura 1. Fluxograma de produção do molho de soja (LUH, 1995).

2.1.2.1 Produção do *Koji*

A mistura da soja cozida, trigo torrado e as cepas inoculadas é chamada de *Koji*. Esta mistura é considerada fonte de enzimas proteolíticas para conversão das proteínas

dos grãos de soja em peptídeos e aminoácidos e de amilase para hidrólise de amido gelatinizado em açúcares simples. Esses metabólitos se tornam nutrientes para as leveduras e bactérias lácticas na fermentação da salmoura. Na produção do *Koji*, flocos ou grãos de soja desengordurados são colocados de molho na água para elevar o teor de umidade dos mesmos e então são cozidos. Os grãos úmidos, contendo 30-45% de umidade, são cozidos a cerca de 170 °C por 20-30 segundos em um tacho contínuo que permite alta pressão e baixo tempo de cozimento. O trigo contém 8% de umidade e é torrado em um torrador contínuo com ar quente a 150 °C por 30-45 segundos à pressão atmosférica e triturado moinho.

A mistura soja-trigo é, depois, inoculada com um iniciador conhecido como *tane-koji*, previamente preparado a partir de cepas de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus soyae*, cultivadas em arroz cozido por 3 a 5 dias a 30 °C até que o arroz esteja coberto de esporos, que são então colhidos. Inocula-se, geralmente, de 0,1 a 0,2% de iniciador em relação à quantidade de mistura. O *tane-koji* é geralmente uma mistura de esporos puros, consistindo em várias cepas em proporções apropriadas. É considerado de boa qualidade quando é capaz de fornecer aroma e sabor característicos ao molho de soja e quando possui altas atividades proteolíticas e amilolíticas e um fácil cultivo (UFSC, 2009).

A mistura inoculada é distribuída em caixas rasas com cerca de 5 cm de profundidade e depois incubadas a 30 °C. Após 24 horas de incubação, a mistura é coberta com uma cultura espessa e branca, formada por *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus soyae*. Como o crescimento dos fungos continua, a temperatura da mistura pode subir acima da temperatura ambiente, para 40 °C ou mais. Logo, a mistura deve ser virada ou mexida periodicamente, para manter umidade e aeração uniformes. À medida que aumenta o tempo de incubação, os fungos continuam a crescer e a cultura torna-se amarela e verde escura. A umidade da mistura diminui gradativamente e, depois de 72 horas, o *shoyu-koji* está pronto para a fermentação em salmoura (AQUARONE et al., 2001).

A automatização do preparo do *Koji* procura fornecer condições adequadas de umidade e temperatura; além disso, busca reduzir o tempo de incubação de 72 para 48 horas, aumentar a atividade enzimática do *Koji*, reduzir a contaminação bacteriana indesejável e os custos de produção. O equipamento possui inoculador e misturador automáticos, grandes dornas rasas perfuradas em ambientes fechados providos de dispositivos mecânicos para virar os substratos durante a incubação. A prática industrial é elevar o teor de umidade da mistura soja-trigo e baixar a temperatura de incubação (AQUARONE et al., 2001).

2.1.2.2 Fermentação em salmoura

O segundo passo para a fermentação do molho de soja é a fermentação em salmoura. A salmoura previne efetivamente o crescimento de microrganismos indesejáveis. Os microrganismos que não toleram concentrações salinas e que estão no *Koji*, como as leveduras selvagens, *Micrococcus* e *Bacillus*, são destruídos e param de crescer no início da fermentação, e apenas os halotolerantes (lactobacilos e leveduras) conseguem crescer. Utiliza-se bacterias lácticas, *Pediococcus halophilus* e as leveduras *Zygosaccharomyces rouxii* e espécies de *Candida*. Todos estes toleram uma concentração de sal de 20 g por 100 mL (LUH, 1995).

O *Koji* é misturado com 20% de salmoura e é transferido em partes para tanques de fermentação. A mistura resultante é chamada *moromi*. É importante o controle de microrganismos na fermentação em salmoura (LUH, 1995).

O *Pediococcus halophilus* é cultivado e adicionado ao *moromi*, que é mexido, ocasionalmente, durante os primeiros estágios do processo para fornecer aeração suficiente para a cultura de leveduras, impedir o crescimento de microrganismos anaeróbicos indesejáveis, manter a temperatura uniforme e facilitar a remoção de dióxido de carbono. Para controlar a taxa de crescimento é necessário manter a mistura a 15 °C no primeiro mês, permitindo que o pH diminua lentamente de 6,5 para 5,0. Então, culturas de *Zygosaccharomyces rouxii* e de *Candida* são adicionadas como iniciadoras. A temperatura do *moromi* pode aumentar lentamente a cerca de 28 °C até que vigorosa fermentação alcoólica comece. Às vezes, é necessário adicionar mais culturas puras de *P. halophilus*, *Z. rouxii* e *Candida* ao *moromi* durante a fermentação (LUH, 1995).

De uma maneira geral, a fermentação em baixas temperaturas fornece melhores resultados, visto que a velocidade de inativação enzimática é lenta e as enzimas permanecem ativas por mais tempo. Um molho de soja de boa qualidade pode ser obtido em fermentação de 6 meses, quando a temperatura do *moromi* é controlada da seguinte maneira: 15 °C durante um mês, seguida por 28 °C durante quatro meses e, terminando a fermentação a 15 °C durante um mês (LUH, 1995).

Durante o período de fermentação, enzimas proteolíticas do *Koji* hidrolisam as proteínas dos grãos de soja e do trigo para formar aminoácidos e peptídeos de baixo peso molecular. O amido é convertido em açúcares simples que são fermentados primariamente a ácido lático, etanol e dióxido de carbono (LUH, 1995).

2.1.2.3 Refino

O processo final na fermentação do molho de soja é o refino, que inclui prensagem, filtração, pasteurização e embalagem. O *moromi* envelhecido é prensado para separar o molho de soja do resíduo. O filtrado obtido é aquecido a 70-80 °C para cessar a maioria das reações microbianas e enzimáticas. As principais alterações que ocorrem durante a pasteurização são a formação de uma coloração marrom, a separação das substâncias coaguladas pelo calor, o aumento da acidez, o escurecimento, a diminuição dos teores de aminoácidos e açúcares redutores e a evaporação dos compostos voláteis. No Japão, ácido benzóico ou *p*-hidroxibenzoato butílico são acrescentados como conservantes, no Brasil, em geral, utiliza-se o sorbato de potássio (AQUARONE et al., 2001). O molho é embalado em garrafas de vidro transparentes, latas esmaltadas ou garrafas de plástico.

2.1.3 Produção do molho de soja por hidrólise ácida

Devido ao tempo necessário para a produção do *shoyu* ser muito extensa, foram feitas algumas tentativas para diminuir esse prazo. A primeira fase (produção do *Koji*) poderia ser substituída por hidrólise ácida da soja com ácido clorídrico como catalisador no cozimento (SBRT, 2010). O hidrolisado é neutralizado com hidróxido de sódio ou carbonato de sódio sob cuidadosa supervisão para não adicionar excesso de álcali. O molho de soja ácido-hidrolisado é refinado por sedimentação, tratamento com carvão ativo, filtração para remoção de substâncias indesejáveis, e vácuo para remoção de substâncias voláteis que não são de interesse. Entretanto, o molho de soja ácido-hidrolisado possui aroma e *flavor* menos atrativos devido à falta de substâncias aromáticas como ésteres, alcoóis e compostos carbonílicos que são derivados do processo de fermentação. Em alguns países, uma combinação de fermentação e de hidrólise ácida é usada com o intuito de reduzir os custos de fabricação do molho de soja, entretanto o produto obtido da fermentação possui uma maior qualidade sensorial (LUH, 1995).

2.1.4 Composição química do molho de soja

Em geral, molhos de soja de boa qualidade contêm 1,0-1,6 g/100 g de nitrogênio total. Cerca de 45% de nitrogênio total é encontrado na forma de peptídeos e 45% de aminoácidos (LUH, 1995). Os teores de açúcares em molho de soja fermentado foram descritos por YOKOTSUKA (1986). Um molho de soja fermentado japonês contém os

seguintes açúcares (g/100 g): arabinose - 0,08; glicose - 2,05; manose - 0,06; galactose – 0,17; xilose - 0,06; dissacarídeo - 0,65; polissacarídeo - 1,15; açúcares não-identificados - 0,23; açúcares totais - 4,45 (como glicose). Os ácidos orgânicos presentes são (g/100 g): ácido acético - 0,16; ácido cítrico - 0,04; ácido fórmico - 0,02; ácido láctico - 0,68; ácido succínico - 0,05; ácidos totais - 0,95 (YOKOTSUKA, 1986).

Na Tabela 1 está apresentada a composição do molho de soja. A composição em aminoácidos da soja, do trigo e do molho de soja é apresentada na Tabela 2. Um total de 18 aminoácidos encontra-se presente nas amostras. Os ácidos glutâmico e aspártico são os aminoácidos presentes em maiores quantidades em molhos de soja fermentados. Arginina, lisina, fenilalanina, serina, treonina, leucina, isoleucina, valina, alanina e prolina estão presentes em quantidades significantes no molho. Uma comparação de aminoácidos presentes no molho de soja fermentado com aqueles presentes na soja e no trigo indicam as seguintes mudanças: arginina é convertida em ornitina no processo de fermentação; triptofano e cistina podem ser usados durante a fermentação como nutrientes; e a quantidade de tirosina diminui no *moromi* (LUH,1995).

Tabela 1. Composição do molho de soja, para cada 100 g de matéria seca

Componente	Teor/100 g
Umidade	57-70 g
Proteína	13-18 g
Gordura	1-2 g
Carboidrato	28-35 g
Fibra	0-1,5 g
Cinza	50-53 g
NaCl	25-30 g
Ca	200 mg
P	200 mg
Fe	14 mg
K	650 mg
Tiamina	0,15-0,5 mg
Riboflavina	0,6 mg
Niacina	0,7-3 mg
Vitamina B12	0,2-1,0 µg
Vitamina C	Traços

Fonte: AQUARONE et al. (2001).

Tabela 2. Composição de aminoácidos na soja, no trigo e no milho de soja

Aminoácido	Composição (g/100 g)		
	Soja	Trigo	Molho de Soja
Arginina	8,42	4,71	2,60
Histidina	2,55	2,12	2,50
Lisina	6,86	2,67	6,50
Tirosina	3,90	3,19	1,00
Triptofano	1,28	1,13	-
Fenilalanina	5,01	4,43	4,20
Cistina	1,58	1,80	0,90
Metionina	1,56	1,74	1,40
Serina	5,57	5,22	5,30
Treonina	4,31	2,76	4,20
Leucina	7,72	6,52	7,30
Isoleucina	5,10	3,78	4,80
Valina	5,38	4,69	5,50
Ácido Glutâmico	21,00	29,30	22,50
Ácido Aspártico	12,01	4,85	10,50
Glicina	4,52	3,94	3,90
Alanina	4,51	3,37	4,40
Prolina	6,28	9,94	6,50
Ornitina	-	-	5,70

Fonte: LUH (1995).

Os parâmetros de qualidade avaliados por LUH (1995) foram pH, acidez, teor de nitrogênio, teor de sal, cor, contaminação microbiana e atributos sensoriais - cor, aroma e *flavor*. Não existe legislação que defina os padrões de identidade e qualidade de molhos de soja, portanto não foi possível comparação com a mesma.

2.2 AMINAS BIOATIVAS

2.2.1 Definição e classificação

As aminas bioativas ou biologicamente ativas são bases orgânicas alifáticas, aromáticas ou heterocíclicas de baixo peso molecular. São, também, definidas como compostos nitrogenados, em que um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia foram substituídos por grupos alquila ou arila, como a histamina, que é uma molécula hidrofílica, apresentando um anel imidazólico e um grupo amino conectados por dois grupos metileno. As aminas são formadas por processos bioquímicos e participam de funções

metabólicas e fisiológicas importantes nos organismos vivos, desempenhando diversas atividades biológicas. São encontradas em alimentos de origem animal, vegetal, bem como em alimentos fermentados (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994; CINQUINA et al., 2004a; GLÓRIA, 2005).

Como indicado na Figura 2, a maioria das aminas foi denominada de acordo com o aminoácido precursor, como por exemplo, a histamina, que é originada da histidina, a tiramina da tirosina, a triptamina do triptofano, e assim por diante. No entanto, os nomes cadaverina e putrescina estão associados à decomposição e putrefação, assim como espermina e espermidina com fluidos seminais onde elas foram encontradas pela primeira vez (HALÁSZ et al., 1994; GLÓRIA, 2005; GLÓRIA & VIEIRA, 2007).

As aminas bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina na molécula, da estrutura química (Figura 3), da via biossintética e das funções que exercem. Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, se classificam em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermidina, espermina e agmatina) (GLÓRIA, 2005). Com relação à estrutura química, as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina). Ainda, em relação à estrutura química, podem ser classificadas em catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (serotonina) e como imidazolaminas (histamina) (SMITH, 1980-81; BARDÓCZ, 1995; SILLA-SANTOS, 1996).

Quanto à via biossintética, as aminas se classificam em naturais, que são formadas durante a biossíntese *in situ*, ou seja, a partir de uma molécula mais simples, à medida que são requeridas (espermina e espermidina), ou podem estar armazenadas nos mastócitos e basófilos (histamina). Por outro lado, as aminas biogênicas são formadas por reações de descarboxilação conduzidas por descarboxilases bacterianas, sendo esta a principal via de formação de aminas nos alimentos (histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina) (SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2005).

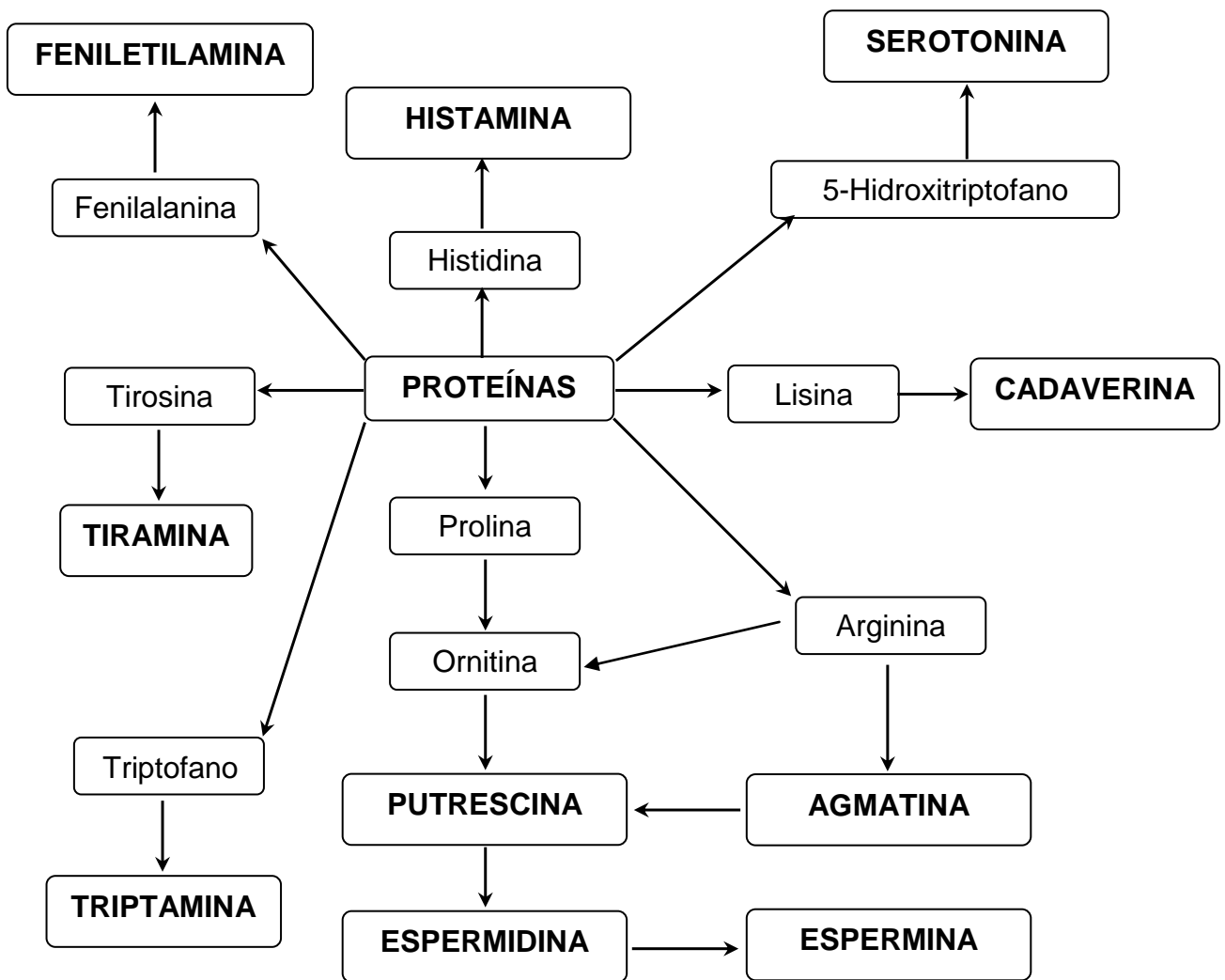


Figura 2. Vias metabólicas para formação de aminas bioativas (NAGATSU, 1991; HALÁSZ et al., 1994; GLÓRIA, 2005).

Com relação à função que exercem, as aminas bioativas podem ser classificadas em moduladoras e promotoras do crescimento, por atuarem no crescimento e manutenção do metabolismo celular e, em vasoativas e neuroativas, devido ao seu efeito nos sistemas vascular e neural (BARDÓCZ et al., 1993).

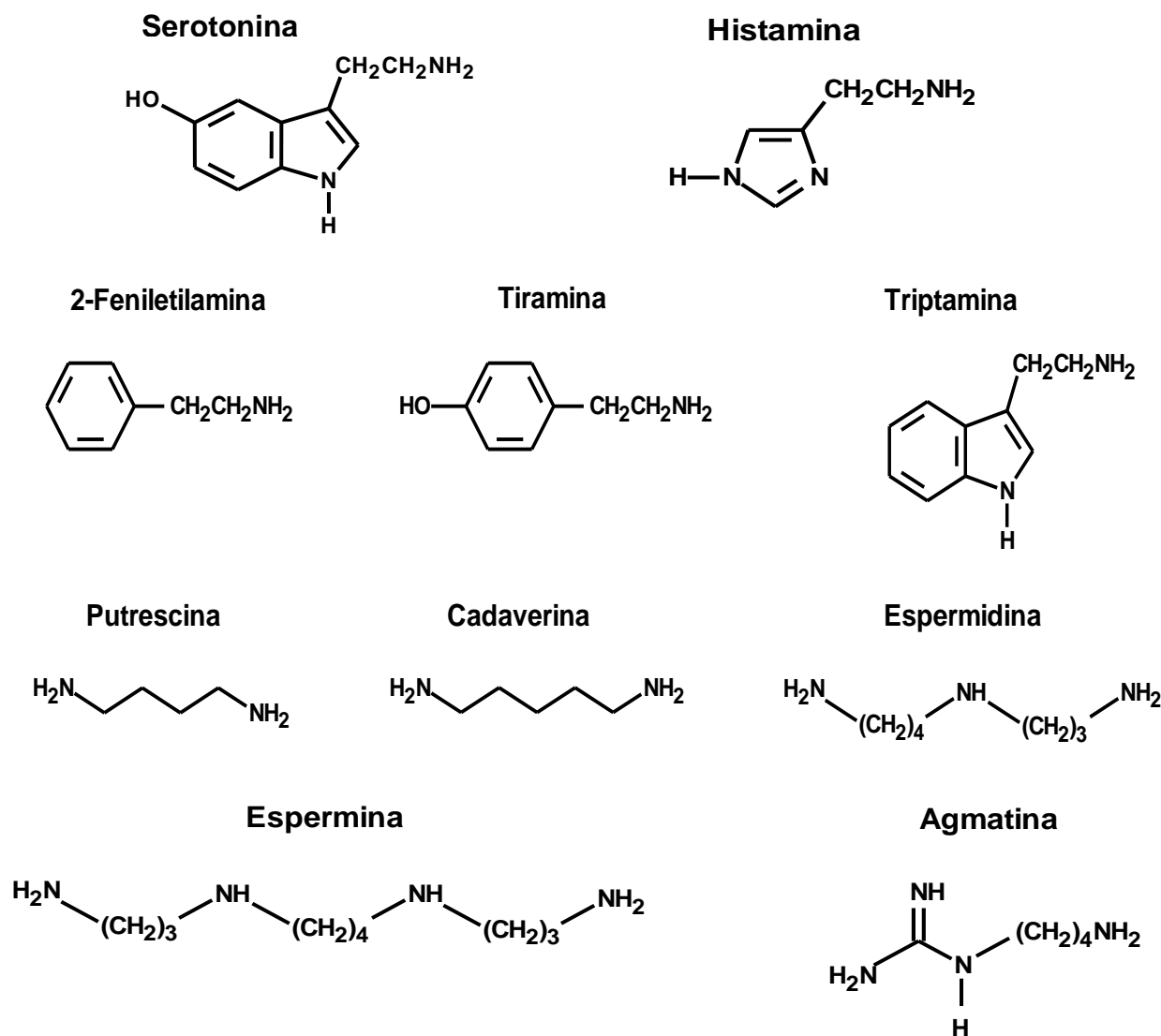


Figura 3. Estrutura química de algumas aminas bioativas.

2.2.2 Formação

As aminas biogênicas podem ser formadas por hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos (Figura 4), sendo a última a principal via de formação (MAIJALA et al., 1993; BARDÓCZ, 1995).



Figura 4. Formação de aminas por descarboxilação de aminoácido (GLÓRIA, 2005).

A formação de aminas biogênicas nos alimentos está condicionada à disponibilidade de aminoácidos livres, presença de microrganismos descarboxilase positivos e, também, às condições favoráveis para o crescimento bacteriano, síntese e ação de enzimas descarboxilantes (SHALABY, 1996).

Os microrganismos com atividade descarboxilante sobre os aminoácidos podem fazer parte da microbiota associada ao alimento, serem introduzidos para obtenção de produtos fermentados, ou ainda, por contaminação antes, durante ou depois do processamento. A quantidade e o tipo de aminas nos alimentos em geral, dependem da natureza, origem, etapas de processamento e microrganismos presentes (HALÁSZ et al., 1994).

Dentre os gêneros bacterianos capazes de descarboxilar um ou mais aminoácidos estão incluídos *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* e *Streptococcus*. Espécies de *Enterobacteriaceae* produzem histamina, tiramina, putrescina e cadaverina (MARINO et al., 2000). Em peixes, *Morganella morgani*, *Klebsiella pneumonia*, e *Hafnia alvei* são consideradas importantes formadoras de histamina (GLÓRIA, 2005).

Fatores como temperatura, pH do meio, tensão de oxigênio, presença de vitaminas e coenzimas, concentração de aminoácidos livres e de carboidratos fermentáveis podem influenciar na produção de aminas pelos microrganismos. Em meio ácido (pH 2,5 a 6,5), a produção de aminas é estimulada como mecanismo de proteção da bactéria (GLÓRIA, 2005), devido ao fato de que altas concentrações do íon H⁺ tornam-se prejudiciais ao microrganismo fazendo com que este sintetize as enzimas descarboxilases (SILLA-SANTOS, 1996). Com relação à temperatura, as descarboxilases são mais ativas em temperaturas inferiores a 30 °C, acima de 40 °C são inativadas e, na faixa de 0 a 10 °C, a atividade dependerá da microbiota presente (HALÁSZ et al., 1994).

As aminas em alimentos podem estar naturalmente presentes no produto, ou serem formadas por microrganismos adicionados (culturas iniciadoras) ou contaminantes, introduzidos devido às condições higiênico-sanitárias inadequadas. Assim sendo, podem ser utilizadas como parâmetro ou critério de qualidade, refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênico-sanitárias durante a fabricação de certos produtos (HALÁSZ et al., 1994; KALAČ et al., 2002; GLÓRIA, 2005).

Para formação das poliaminas, os aminoácidos ornitina e arginina são os precursores, sendo a putrescina um composto intermediário obrigatório. Para formar a putrescina, a arginina é transformada em ornitina pela ação da enzima arginase e, em

seguida, a ornitina sofre a ação da ornitina descarboxilase (ODC) formando a putrescina (HILLARY & PEGG, 2003; MOINARD et al., 2005). A putrescina pode ser formada por diferentes vias dependendo do organismo vivo. Em animais e fungos a formação da putrescina ocorre via descarboxilação da ornitina. Células bacterianas possuem uma via alternativa, a descarboxilação da arginina formando agmatina. Em vegetais, a síntese pode ocorrer tanto via agmatina quanto via ornitina (BARDÓCZ, 1995).

Na síntese da espermidina, é adicionado à putrescina um grupo aminopropil derivado da metionina, via S-adenosilmetionina (SAM), e este mesmo grupo é adicionado à espermidina para formar a espermina. As enzimas espermidina e espermina sintases e SAM descarboxilase participam destas reações (GLÓRIA, 2005).

2.2.3 Funções

Estudos com microrganismos, animais e plantas têm demonstrado a importância das aminas bioativas no metabolismo e crescimento (SMITH, 1984). As aminas atuam como reservas de nitrogênio, substâncias naturais de crescimento de microrganismos e de vegetais, como hormônios ou fatores de crescimento, aceleram o processo metabólico, participam na regulação da secreção gástrica, na contração e relaxamento do músculo liso, são biomoduladoras e estimulam os neurônios sensoriais, motores e cardiovasculares (SMITH, 1980-1981; STRATTON et al., 1991; BAUZA et al., 1995).

A Tabela 3 apresenta um resumo da importância fisiológica das aminas bioativas. As poliaminas são indispensáveis às células vivas, desempenhando papel importante em diversas funções fisiológicas de humanos e animais (KALAČ & KRAUSOVÁ, 2005). Essas possuem várias interações eletrostáticas com macromoléculas, especialmente DNA (ácido desoxirribonucléico), RNA (ácido ribonucléico) e proteínas, e estão envolvidas na regulação e estimulação de suas sínteses. Estimulam a diferenciação celular, interagindo e moldando vários sistemas intracelulares. São importantes na permeabilidade e estabilidade das membranas celulares e reduzem a permeabilidade da mucosa a macromoléculas e proteínas alergênicas, prevenindo alergias alimentares (DROLET et al., 1986; BARDÓCZ, 1995; LÖSER 2000). De acordo com DROLET et al. (1986) e BARDÓCZ (1995), a espermina e espermidina, assim como as diaminas putrescina e cadaverina, são eficientes sequestradoras de radicais livres em sistemas enzimáticos, químicos e *in vitro*; podem inibir peroxidação de lipídeos e prevenir a senescência. Espermina e espermidina também têm implicações na renovação e

funcionalidade do trato digestivo e na maturação da mucosa intestinal (BARDÓCZ et al., 1993; MOINARD et al., 2005).

Tabela 3. Funções metabólicas e fisiológicas das aminas bioativas

Aminas Bioativas	Funções
Espermidina Espermina	<ul style="list-style-type: none"> - Regulação e estimulação da síntese de DNA, RNA e proteínas - Estimulação da diferenciação celular - Permeabilidade e estabilidade das membranas celulares - Recicladores de radicais livres - Manutenção da alta atividade metabólica de um intestino saudável funcionando normalmente - Redução da permeabilidade da mucosa a macromoléculas e prevenção de alergias alimentares - Processos fisiológicos em plantas superiores: crescimento da raiz, embriogênese somática, controle do pH intracelular, desenvolvimento da flor e fruto, resposta a estresse abiótico, síntese de metabolitos secundários, senescência, resposta da planta a patógenos
Putrescina Cadaverina	<ul style="list-style-type: none"> - Recicladores de radicais livres
Histamina	<ul style="list-style-type: none"> - Forte dilatador capilar - Efeito hipotensivo - Psicoativa - Efeito protetor contra predadores em plantas
Serotonina	<ul style="list-style-type: none"> - Vaso e broncoconstritor - Neurotransmissor - Efeito protetor contra predadores em plantas
Tiramina Triptamina Feniletilamina	<ul style="list-style-type: none"> - Aminas vasoconstritoras - Precursoras de compostos com significância biológica

Fonte: GLÓRIA & VIEIRA (2007).

Em plantas de grande porte, as poliaminas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, incluindo morfogênese, enraizamento, floração e senescência (SHIOZAKI et al., 2000). As poliaminas podem ser usadas como fonte de nitrogênio orgânico e desempenhar um papel crítico em diversos processos, entre eles, crescimento da raiz, controle do pH intracelular, desenvolvimento de flor e fruto e resposta ao estresse abiótico, como por exemplo, deficiência de potássio, choque osmótico, estiagem e infecção patogênica. Poliaminas são também importantes na síntese de metabolitos secundários de interesse biológico, como por exemplo, nicotina e alcalóides (FLORES et

al., 1989; WALTERS, 2003). Estão associadas com a parede celular e membranas; regulam a pectinesterase e a ligação com a pectina, atrasando o amolecimento do fruto e seu envelhecimento (LEITING & WICKER, 1997). O efeito firmador das poliaminas é similar ao do cloreto de cálcio e pode estar relacionado à sua habilidade de ligação entre a parede celular e membranas, estabilizando-as, ou por tornar a parede celular menos acessível a enzimas responsáveis pelo amadurecimento (BOUCHEREAU et al., 1999).

Algumas aminas são psicoativas ou vasoativas. A histamina, serotonina, dopamina, adrenalina e noradrenalina são psicoativas e atuam como neurotransmissoras no sistema nervoso central. Os neurônios que contêm histamina podem participar na regulação da ingestão de água, da temperatura corporal e da secreção de hormônio antidiurético, bem como no controle da pressão arterial e da percepção da dor (GOODMAN & GILMAN, 2003). As aminas vasoativas atuam direta ou indiretamente no sistema vascular, podendo ser vasoconstritoras (pressoras) ou vasodilatadoras. Tiramina, feniletilamina, isoamilamina, 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 vaso e bronco-constritora, está envolvida na regulação de inúmeras funções importantes, incluindo sono, sede, fome, humor e atividade sexual (GLÓRIA, 2005).

Tipicamente, a histamina provoca dilatação dos pequenos vasos sanguíneos, resultando em rubor, diminuição da resistência periférica total, redução da pressão arterial sistêmica, aumento da contração e velocidade do batimento cardíaco e aumento da permeabilidade capilar (GOODMAN & GILMAN, 2003). Além disso, atua na contração e relaxamento do músculo liso, na regulação da secreção gástrica e como estimulante dos neurônios dos sistemas motor e sensorial (SMITH, 1980-1981; TAYLOR, 1986; STRATTON et al., 1991; GLÓRIA, 2005).

Algumas aminas podem ter papel protetor contra predadores. Outras aminas são importantes como precursoras de componentes biológicos importantes, como por exemplo, o hormônio de plantas, ácido indol-3-acético, e o ácido fenilacético que são derivados da triptamina e feniletilamina, respectivamente (COUTTS, 1986).

2.2.4 Aspectos toxicológicos

As aminas bioativas são substâncias importantes na dieta humana, pois desempenham funções fisiológicas essenciais. As aminas presentes nos alimentos são rapidamente metabolizadas no organismo por conjugação, ou mediante reações de

oxidação por enzimas aminoxidases, como as monoaminoxidases (MAO), as diaminoxidases (DAO) e as poliaminoxidases (PAO) (SMITH, 1980-1981). Sendo assim, as amins geralmente não apresentam risco à saúde humana. Entretanto, quando ingeridas em elevadas concentrações ou quando o sistema de catabolismo das amins é inibido, podem causar efeitos tóxicos (HALÁSZ et al., 1994; LANGE et al., 2002).

Indivíduos saudáveis podem metabolizar as amins presentes nos alimentos por acetilação e oxidação (Figura 5). Amins biogênicas são oxidadas pelas MAO e DAO. Poliaminas, em geral, são primeiramente acetiladas e depois oxidadas pelas PAO (GLÓRIA, 2005).

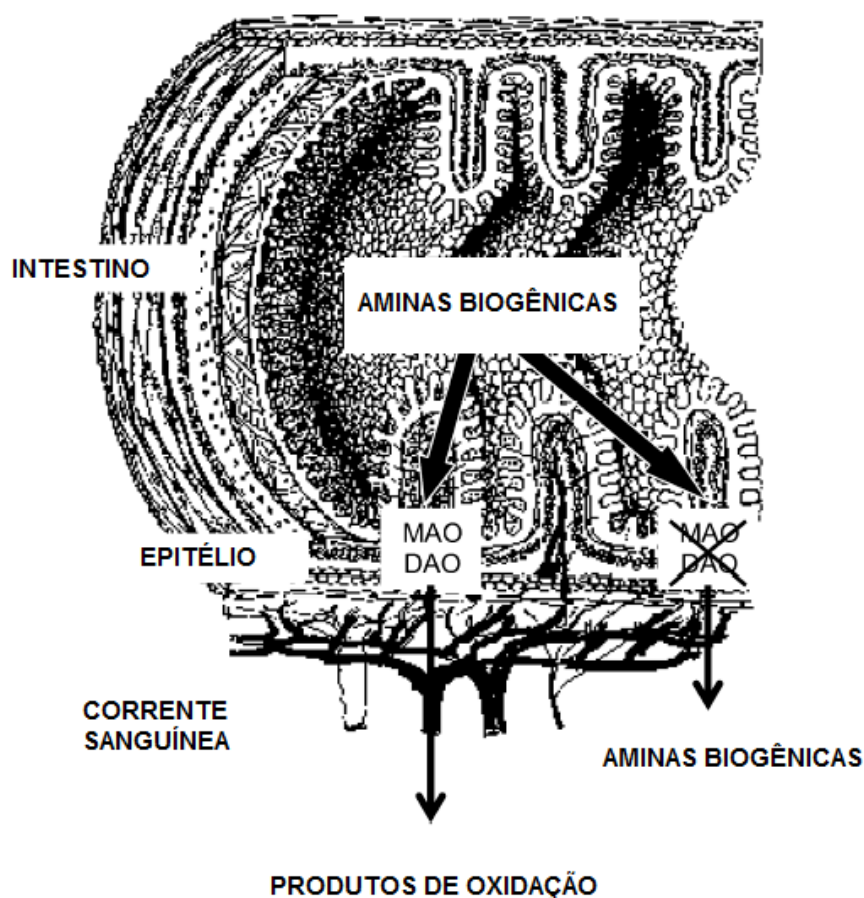


Figura 5. Esquema da absorção das amins biogênicas pelo intestino em condições normais e na ausência das enzimas oxidases (ANCÍN-AZPILICUETA et al., 2008). MAO: monoaminoxidases; DAO: diaminoxidases

Entretanto, problemas podem ocorrer, caso uma quantidade excessiva seja ingerida e/ou os mecanismos naturais para o catabolismo das amins sejam geneticamente deficientes ou prejudicados por alguma doença ou ação de fármacos. Indivíduos com problemas respiratórios ou coronarianos, hipertensão, com deficiência em vitaminas B₁₂ e com problemas gastrintestinais (gastrite, síndrome do intestino irritado,

doença de Crohn, úlcera de estômago) são um grupo de risco, uma vez que a atividade das aminoxidases em seus intestinos é geralmente menor do que em indivíduos saudáveis. Pacientes tomando medicamentos inibidores da MAO, DAO e PAO podem também ser afetados, pelo fato dessas drogas impedirem o catabolismo de aminas (Figura 5). Os inibidores de MAO e DAO são usados no tratamento de estresse, depressão, doença de Alzheimer e Parkinson, síndrome do pânico e fobia social (FUZIKAWA et al., 1999; GLÓRIA, 2005).

Segundo BAUZA et al. (1995), o etanol também pode atuar como inibidor da MAO, intervindo no metabolismo das catecolaminas, tiramina e feniletilamina

Altos níveis de aminas biogênicas estão relacionados a numerosos episódios de intoxicação, particularmente por histamina e tiramina. A intoxicação por histamina se manifesta de poucos minutos a várias horas após a ingestão do alimento contendo esta amina. Primeiramente, rubor facial e no pescoço é observado, acompanhado por uma sensação de calor, gosto metálico e desconforto. Frequentemente, observa-se uma intensa e pulsante dor de cabeça. Outros sintomas podem ser palpitações cardíacas, tontura e fraqueza, sede, inchaço dos lábios, urticária, pulsação rápida e fraca e distúrbios gastrointestinais. No entanto, os sintomas mais comuns são urticária, diarreia e dor de cabeça. Em casos severos, bronco espasmos, sufocação e respiração difícil são reportados. A recuperação, em geral, ocorre 8 h após a ingestão (TAYLOR, 1986; SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2005; LANDETE et al., 2007).

A histamina pode ser catabolizada por diferentes reações (Figura 6). As duas principais rotas são a oxidação a imidazol-acetaldeído, pela DAO e metilação a 1,4-metil-histamina, pela histamina N-metil-transferase (HMT). Em mamíferos, 60 a 80% dos metabólitos de histamina são derivados da desaminação oxidativa. As aminoxidases estão envolvidas em ambas as rotas; convertem 1,4-metil-histamina ao aldeído correspondente e têm um menor papel na conversão de histamina a imidazol-acetaldeído. Inibidores da MAO podem interferir em qualquer destes estágios, embora o metabolismo da 1,4-metil-histamina seja um dos mais afetados, já que a DAO está primariamente envolvida na conversão de histamina a imidazol-acetaldeído. Esses metabólitos têm pouca ou nenhuma atividade e são excretados na urina (GLÓRIA, 2005).

As aminas putrescina e cadaverina podem potencializar o efeito tóxico da histamina, por inibir as enzimas DAO, aumentando o seu transporte através da parede gastrintestinal (TAYLOR, 1986). A presença destas substâncias potencializadoras pode explicar porque, em alguns casos, peixes deteriorados e queijos maturados são mais tóxicos que a mesma quantidade de histamina quando ingerida sozinha (SOARES &

GLÓRIA, 1994; GLÓRIA, 2005). Após liberação dos grânulos de armazenamento, a histamina exerce um papel central na hipersensibilidade imediata e nas respostas alérgicas. As ações sobre o músculo liso brônquico e sobre os vasos sanguíneos respondem por muitos sintomas da reação alérgica (GOODMAN & GILMAN, 2003).

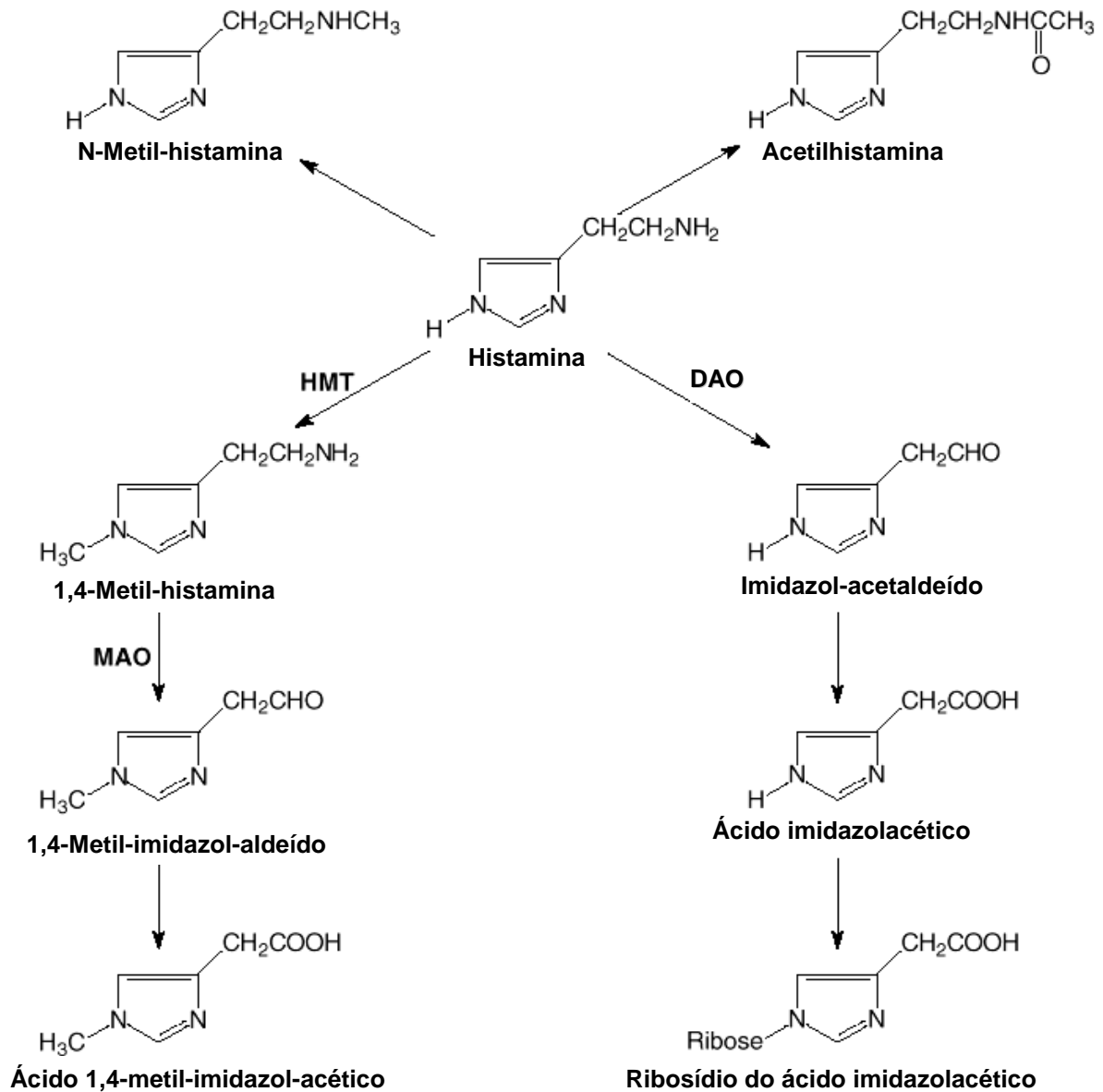


Figura 6. Metabolismo da histamina em humanos (GLÓRIA, 2005).

As poliaminas espermidina e espermina podem acelerar o crescimento de tumores. Sendo assim, para pacientes em tratamento de câncer recomenda-se uma dieta com reduzidos teores destas substâncias de forma a diminuir o crescimento e progresso do

tumor (BARDÓCZ, 1995; LIMA & GLÓRIA, 1999). A espermidina, espermina, putrescina e cadaverina podem reagir com nitrito sob condições ácidas para formar N-nitrosaminas, muitas das quais apresentam atividade cancerígena (HALÁSZ et al., 1994; SILLA-SANTOS, 1996; ELIASSEN et al., 2002).

A tiramina é outra amina envolvida em intoxicação. Quando alimentos contendo tiramina em altos níveis são ingeridos, uma grande quantidade desta amina não metabolizada pode atingir a corrente sanguínea. Este fato leva à liberação de noradrenalina pelo sistema nervoso simpático, acarretando em uma variedade de reações fisiológicas. Ocorre um aumento na pressão sanguínea pela vasoconstrição periférica e aumento da potência cardíaca. A tiramina pode também dilatar as pupilas, causando lacrimação, promover salivação, febre, vômito, dor de cabeça e aumento na taxa de respiração e teor de açúcar no sangue.

Quando consomem alimentos ricos em tiramina, aproximadamente 30% dos indivíduos com enxaqueca clássica podem ter crise (GLÓRIA & VIEIRA, 2007). Em pacientes em tratamento com inibidores da MAO, a tiramina pode causar enxaqueca, induzir hemorragia cerebral e parada cardíaca (MAGA, 1978; SMITH, 1980-1981; MAIJALA et al., 1993; LEHANE & OLLEY, 2000). Vários casos de intoxicação por tiramina foram reportados pela ingestão de queijos e bebidas alcoólicas. Os sintomas duram de 10 minutos a 6 horas, durante os quais quadros de hipertensão e dor de cabeça variam. Podem ocorrer também alterações visuais, vômitos, contração muscular, confusão mental ou excitação. Dores no peito simulando angina pectorial, falha coronariana grave, edema pulmonar e hemorragia cerebral já foram descritos. Incidentes fatais foram reportados na literatura (SHALABY, 1996; GLÓRIA & VIEIRA, 2007). A Tabela 4 apresenta diversos efeitos tóxicos relacionados as aminas bioativas.

A triptamina possui ação farmacológica similar à tiramina. Altos níveis podem exercer efeitos diretos na musculatura lisa, causar dor de cabeça e aumentar a pressão sanguínea pela constrição do sistema vascular (VANDERKERCKHOVE, 1977; SMITH, 1980-1981). Feniletilamina, assim como tiramina, causam um aumento na pressão sanguínea pela liberação de noradrenalina do tecido, podendo ser o causador de enxaqueca.

Tabela 4. Efeitos tóxicos das aminas bioativas

Efeitos tóxicos	Aminas envolvidas	Sintomas
Intoxicação Histamínica	Histamina (efeito tóxico potencializado pela putrescina, cadaverina, espermina, triptamina, tiramina, feniletilamina e álcool)	Gastrintestinal: náusea, vômito, diarreia, cólica abdominal Neurológico: dor de cabeça pulsante, palpitação, rubor facial e no pescoço, coceira, pulsação rápida e fraca, tontura, fraqueza e formigamento Hemodinâmico: hipotensão, dilatação capilar Cutâneo: erupção, urticária, edema, inflamação localizada Casos severos: bronco espasmos, sufocação, respiração difícil
Intoxicação por Tiramina	Tiramina	Dor de cabeça, febre, aumento na pressão sanguínea, vômito, transpiração, dilatação da pálpebra e pupilas, salivação, lacrimação, respiração aumentada, palpitação e dispnéia
Reação com queijo ou crise hipertensiva (associada a pacientes medicados com MAOI ¹)	Tiramina Feniletilamina	Crise hipertensiva, dor de cabeça severa, hemorragia cerebral, deficiência cardíaca, edema pulmonar, alterações na visão, palpitação, náusea, sudação, vômito, contração muscular, excitação, confusão mental, pressão sanguínea alta, febre e transpiração
Enxaqueca	Tiramina Feniletilamina Triptamina Serotonina	Dor de cabeça pulsante e ataque de enxaqueca

¹ MAOI – inibidor da monoaminoxidase.
Fonte: GLÓRIA (2005).

A determinação da toxicidade das aminas biogênicas é uma tarefa difícil que depende da eficiência dos mecanismos de detoxificação dos diferentes indivíduos (KALAC & GLÓRIA, 2009). Limites máximos de 10 mg de histamina, 10 mg de tiramina e 3 mg de feniletilamina em 100 g de alimentos foram sugeridos por HALÁSZ et al. (1994). No entanto, a ingestão de alimentos contendo 6 mg/100 g de tiramina podem causar enxaqueca e de 10 a 25 mg/100 g podem levar a crises hipertensivas em indivíduos em tratamento com medicamentos inibidores da MAO (FUZIKAWA et al., 1999). A dose tóxica para histamina em bebida alcoólica é de 2 mg/L (BRINK et al., 1990; LIMA &

GLÓRIA, 1999). Entretanto, indivíduos sensíveis à histamina, asmáticos ou portadores de úlcera são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da histamina (HALÁSZ et al., 1994).

2.2.5 Aminas como critério de qualidade

As aminas podem ser empregadas como índice ou critério de qualidade (DONHAUSER et al., 1993), refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênicas prevalentes durante a produção, processamento e armazenamento de certos produtos (TAYLOR, 1986; VECIANA-NOGUÉS et al., 1997). Podem também ser usadas como um indicador do alimento deteriorado, uma vez que a deterioração microbiana pode ser acompanhada pelo aumento da produção de descarboxilases (HALÁSZ et al., 1994). Uma vantagem do uso de aminas como critério de qualidade reside no fato destas serem termo-resistentes, permanecendo no alimento mesmo após tratamento térmico (LIMA & GLÓRIA, 1999). Até o momento, elas não têm sido usadas como critério de qualidade para molho de soja.

2.2.6 Aminas bioativas em soja

Muitas frutas e vegetais contêm pequenas quantidades de poliaminas já que as mesmas estão relacionadas ao crescimento e metabolismo das células. As aminas presentes em maior quantidade em grãos de soja são putrescina, cadaverina, agmatina, espermina e espermidina, sendo a última encontrada em maior quantidade (GLÓRIA et al., 2005).

2.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS APLICADOS À ANÁLISE DE AMINAS BIOATIVAS EM MOLHO DE SOJA

A determinação de aminas bioativas em alimentos não é uma técnica simples, pois estas substâncias possuem estruturas químicas distintas e estão presentes em faixas de concentração variáveis, às vezes muito baixas, em uma matriz complexa. Técnicas cromatográficas, especialmente a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são as mais utilizadas, uma vez que fornecem alta resolução, sensibilidade e versatilidade, e o tratamento da amostra é simples (LAVIZZARI et al., 2006).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para determinar o teor de aminas bioativas em diferentes tipos de alimentos. Entretanto, pesquisas continuam a serem feitas de forma a desenvolver métodos mais simples, rápidos, sensíveis e de menor custo. As

técnicas para determinação de aminas bioativas envolvem as etapas de extração, derivação, separação e quantificação (TAYLOR, 1985).

2.3.1 Extração

O tipo e a natureza das aminas e dos alimentos a serem analisados afetam significativamente a eficiência da extração (ZEE et al., 1983). Nesta etapa, dois parâmetros são importantes: o solvente utilizado, diretamente relacionado com a matriz a ser analisada, e o preparo da amostra (SIMON-SARKADI, 1994; MORET & CONTE, 1996).

As reações de protonação da amina e sua reversão para a forma não protonada, em função do pH, são extremamente importantes no isolamento e análise destas substâncias, bem como a solubilidade das aminas e de seus sais, em soluções aquosas e em solventes orgânicos (CUSTÓDIO, 2006). A histamina apresenta elevada solubilidade em água e clorofórmio quente. Entretanto, a forma de sal diidrocloreto apresenta solubilidade em água e metanol, e média em etanol (WINDHOLZ, 1996).

A extração de aminas de uma matriz sólida pode ser realizada utilizando-se água à temperatura ambiente (INGLES et al., 1980; INGLES et al., 1985) ou a temperaturas elevadas (VOIGHT et al., 1974), solventes orgânicos ou reagentes ácidos. Solventes orgânicos, como metanol (HUI & TAYLOR, 1983; REUVERS et al., 1986), acetona (FOY & PARRAT, 1961), etanol (SATO et al., 1970) e acetonitrila-ácido perclórico já foram utilizados para extrair aminas livres (MORET & CONTE, 1996). Na extração de aminas ligadas a outros componentes da matriz, são empregados reagentes ácidos, como ácido clorídrico (RICE et al., 1976; CHANG et al., 1985), ácido perclórico (KOEHLER & EITENMILLER, 1978; ZEE et al., 1985; OHTA et al., 1993) e ácido tricloroacético (ZEE et al., 1983; VALE & GLÓRIA, 1997).

Os ácidos mais utilizados na extração de aminas bioativas em molho de soja são o ácido tricloroacético e o ácido perclórico (STUTE et al., 2002; YONGMEI et al., 2009). No método descrito por STUTE et al. (2002), as aminas foram extraídas com ácido tricloroacético e os componentes interferentes, especialmente aminoácidos, foram removidos por extração em fase sólida por troca iônica. No método descrito por YONGMEI et al. (2009), as aminas biogênicas foram extraídas adicionando-se ácido perclórico 0,4 M a 5 mL de molho de soja.

2.3.2 Separação

Vários métodos cromatográficos podem ser utilizados para a separação de aminas bioativas em alimentos, dentre estes, as cromatografias em papel, em camada delgada e líquida de alta eficiência, sendo a última mais seletiva e sensível, permitindo a detecção de pequenas quantidades de aminas (SHALABY, 1995; LAPA-GUIMARÃES, 2005).

A separação e quantificação das aminas bioativas por CLAE oferecem maiores vantagens sobre outros métodos, pois este permite a separação e quantificação simultânea (TAYLOR, 1985; VALE & GLÓRIA, 1997). A CLAE em fase reversa é considerada a técnica mais adequada para análise de aminas em alimentos (MORET & CONTE, 1996).

HUI & TAYLOR (1983), GLÓRIA & DAESCHEL (1995), e IZQUIERDO-PULIDO et al. (1996) utilizaram as colunas Ultrasphere ODS, Novapack C₁₈ e μ Bondapack C₁₈, respectivamente, para separar aminas bioativas por cromatografia líquida. A separação pode ser feita por sistema isocrático ou por gradiente de eluição, sendo os solventes mais comumente usados a água, o metanol e a acetonitrila (CHANG et al., 1985).

A introdução do contra-íon como o sal sódico dos ácidos hexanosulfônico, heptanosulfônico ou octanosulfônico na fase móvel utilizada na CLAE de fase reversa melhora a separação das aminas. Isto ocorre devido à neutralização das aminas, aumentando o seu tempo de retenção na coluna (LIMA, 1999). KOEHLER & EITENMILLER (1978) e CHANG et al. (1985) introduziram o par iônico ácido heptanosulfônico e o sal sódico do ácido octanosulfônico, respectivamente, à fase móvel para obter melhor separação pelo sistema isocrático e picos mais bem definidos. CHANG et al. (1985) observaram que a melhor separação obtida para histamina, tiramina e triptamina foi utilizando o sal sódico do ácido octanosulfônico 0,02 mol/L em acetonitrila: água (80:20). GLÓRIA & DAESCHEL (1995) obtiveram melhores resultados para amostras de vinho utilizando a fase móvel: tampão acetato 0,2 mol/L + sal sódico do ácido octano-sulfônico 10 mmol/L dissolvido em 100 mL de água + acetonitrila: metanol (9:1, v/v).

2.3.3 Detecção

A detecção de aminas em matrizes complexas torna-se difícil devido ao fato destas estarem, geralmente, presentes em baixas concentrações. Além disto, a maioria das aminas não apresenta absorção na região do ultra-violeta (UV) e nem fluorescência,

tornando-se necessário um processo de derivação para aumentar a absorvância e, conseqüentemente, diminuir o limite de detecção (BUSTO et al., 1994; KIRSCHBAUM et al., 1994).

Alguns dos reagentes de derivação normalmente empregados na análise de aminas são 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC), naftaleno-2,3-dicarboxialdeído (KIRSCHBAUM et al., 1994), cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno sulfonila (cloreto de dansila) (MALLE et al., 1996; DUFLOS et al., 1999; LAPA-GUIMARÃES, 2005), fluorescamina e *o*-ftalaldeído (OPA) (VALE & GLÓRIA, 1997; DALGAARD et al., 2006).

MIETZ & KARMAS (1978) e HUI & TAYLOR (1983) quantificaram várias aminas por detecção no ultravioleta a 254 nm, após derivação com cloreto de dansila (DnsCl). IBE et al. (1991) também utilizaram cloreto de dansila para derivar as aminas, porém a quantificação foi realizada com detector de fluorescência. A grande maioria dos métodos emprega detecção fluorimétrica com derivação pré ou pós-coluna (ÖNAL, 2007).

O uso de OPA, ao invés do cloreto de dansila e da fluorescamina, é preferido devido à grande seletividade para aminas (Figura 7) e ao aumento da sensibilidade pelo método de fluorescência (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993; LAVIZZARI et al., 2006). O uso de derivação pós-coluna é recomendado por ser o período de tempo entre a formação do complexo e a detecção curto e padronizado (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993). Nos procedimentos de derivação pós-coluna, o OPA é o reagente mais utilizado (KHUHAWAR & QURESHI, 2001).

GLÓRIA & DAESCHEL (1995) utilizaram derivação pós-coluna com OPA para determinar tiramina, agmatina, 2-feniletilamina, espermidina, triptamina, espermina, putrescina, serotonina, cadaverina e histamina em vinho, utilizando detector de fluorescência. LAVIZZARI et al. (2006), utilizando o mesmo método de detecção, determinaram estas aminas bioativas, além de octopamina e dopamina, em produtos de origem vegetal.

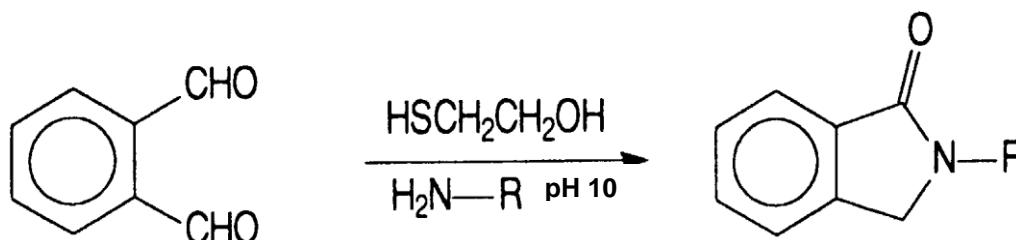


Figura 7. Reação de *o*-ftalaldeído com aminas primárias na presença de mercaptoetanol (adaptado de CONCA et al., 2001).

2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A necessidade de se mostrar a qualidade de análises quantitativas e qualitativas, por meio de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações seguras, exatas e interpretáveis sobre a amostra, este deve ser submetido a uma minuciosa avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004).

A *International Organization for Standardization* (ISO) define validação como a confirmação, por meio de exame e fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos específicos do método, para um uso pretendido, são atendidos (ABNT, 1994). Para métodos analíticos, a validação significa o processo de estabelecimento de características de desempenho e limitações de um método, identificando quais fatores podem afetar o seu desempenho e qual a extensão da influência destes fatores, além de demonstrar que o método é adequado ao propósito (EURACHEM, 1998).

Embora existam razões legais, técnicas e comerciais que justifiquem a implantação da validação de métodos analíticos, não existe uma norma estabelecida em âmbito nacional ou internacional. Além disso, neste âmbito existem diferentes organizações que definem os parâmetros para validação de métodos, sendo algumas definições divergentes entre as diversas organizações. Não há um procedimento normalizado, comum a todas, que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais (RIBANI et al., 2004).

A NBR ISO/IEC 17025:2005 estabelece que métodos normalizados adaptados, não normalizados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados (ABNT, 2005). O guia para a validação de métodos do EURACHEM, por sua vez, sugere que mesmo para métodos normalizados, verificações de parâmetros de desempenho devem ser realizadas. Casos em que o controle de qualidade indicar alterações de um método com o tempo, deve-se também realizar a validação (SOUZA & BRITO, 2002).

O laboratório deve decidir quais parâmetros de desempenho do método necessitam ser caracterizados a fim de validar o método (EURACHEM, 1998). Os parâmetros de desempenho analítico, também denominados de parâmetros analíticos, características de desempenho ou figuras analíticas de mérito, devem ser baseados na intenção do uso do método. Desta forma, os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário. É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (RIBANI et al., 2004).

Apesar da divergência quanto à inclusão dos parâmetros de desempenho em um processo de validação de um método analítico, são empregados, normalmente, os seguintes itens: exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, sensibilidade, especificidade, robustez, estabilidade e intervalo de aplicação (LANÇAS, 2004).

JENKE (1996) avaliou a utilização dos parâmetros de desempenho para validação de métodos nas áreas governamental, industrial e acadêmica, observando que os itens exatidão e precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) apresentavam-se com maior frequência, seguidos de especificidade, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, robustez e sensibilidade. Neste estudo, considerou-se que a exclusão dos parâmetros de desempenho exatidão e precisão implicaria na necessidade de justificativas pertinentes, enquanto a exclusão de parâmetros menos frequentes, como sensibilidade, seria menos controversa. Entretanto, SOUZA & BRITO (2002) ressaltaram que a avaliação da sensibilidade torna-se fundamental em protocolos de validação para comparação de métodos. Assim, a seleção dos parâmetros de desempenho deve estar estritamente relacionada com os objetivos da validação.

Todas as etapas devem ser minuciosamente avaliadas na estratégia de validação, desde a coleta e a preservação das amostras até a emissão do resultado final, com documentação dos resultados obtidos em cada etapa (SOUZA et al., 2001). Os parâmetros de desempenho mais comumente utilizados em validação de métodos analíticos estão definidos a seguir.

2.4.1 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (EURACHEM, 1998).

Pode-se confirmar a linearidade e determinar a faixa de trabalho construindo-se curvas analíticas da concentração do analito em função da resposta obtida no sistema de detecção, com replicatas em torno da concentração esperada do analito.

Os experimentos descritos para avaliação da linearidade frequentemente envolvem preparo de curvas com ou sem matriz, em sua maioria com cinco a seis níveis de concentração, incluindo ou não o ponto zero, e com um mínimo de duas a sete replicatas por nível. O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) é consenso como ferramenta estatística para avaliação da linearidade. A maior parte das referências

recomenda a estimativa dos parâmetros e dos resíduos (erros) da regressão, além da inspeção visual do gráfico x-y e do gráfico dos resíduos da regressão (SOUZA, 2007).

Como os estudos de validação são baseados em hipóteses estatísticas, uma verificação básica das premissas relacionadas aos testes estatísticos é fundamental para garantia de que os princípios destes testes não sejam afetados e para que os resultados obtidos sejam sustentados (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002). Assim, previamente à realização de qualquer inferência, é necessário examinar as premissas para determinar se os dados são apropriados à aplicação dos testes (SOUZA, 2007).

O método utilizado para análise de dados é o MMQO. O ajuste de uma equação de calibração pelo MMQO assume várias premissas relativas aos resíduos da regressão e ao modelo: i) os resíduos são variáveis aleatórias com média zero $E(\varepsilon_i) = 0$ e variância $V(\varepsilon_i) = \sigma^2$ constante e desconhecida; ii) os resíduos são variáveis normalmente distribuídas $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$; iii) os resíduos são homoscedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de X_i ; iv) o resíduo de uma observação ε_i não é correlacionado com o resíduo em outra observação ε_j , ou seja, $cov(\varepsilon_i, \varepsilon_j) = 0$, sendo $i \neq j$. Os resíduos não são apenas não correlacionados, mas independentes; e v) a relação entre X_i e Y_i é linear (SOUZA, 2007).

2.4.2 Seletividade

A seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação (LANÇAS, 2004). Se um método é específico, ele deve produzir resposta para um único analito. Um método seletivo produz resposta para vários analitos que podem se distinguir entre si. Geralmente, a especificidade é considerada como 100 % de seletividade (EURACHEM, 1998). Para garantir a especificidade do método, deve-se avaliar se o sinal medido pelo equipamento é devido exclusivamente ao analito ou resulta da soma das contribuições de múltiplos componentes.

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante o processo de validação e subsequente uso do método. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004).

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade em métodos de separação é pela comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada desta (padrão), garantindo que nenhum interferente

está co-eluído no tempo de retenção desta substância. Outro procedimento para avaliar a seletividade é por meio da coleta do composto de interesse e realização de nova análise por outra técnica cromatográfica, ou com métodos e técnicas que são específicos para a estrutura da substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

2.4.3 Limite de detecção

O limite de detecção é a menor concentração de um analito na matriz que pode ser identificada com nível de confiança especificado (EURACHEM, 1998); ou seja, corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato (LANÇAS, 2004).

Experimentalmente, o limite de detecção pode ser obtido por vários procedimentos, dentre os quais: método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

O método visual é baseado na utilização da adição de concentrações conhecidas da substância de interesse à matriz, de modo a distinguir sinal analítico de ruído, pela visualização da menor concentração visível (detectável). Para métodos que apresentam ruído da linha de base, o limite de detecção poderá ser obtido pela relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1, que corresponde à concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada.

De acordo com AOAC (1998), o limite de detecção pode ser encontrado a partir da leitura de 20 ou mais amostras brancas. O limite de detecção é o valor médio das leituras adicionado de três desvios padrão da média.

2.4.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração do analito na matriz que pode ser determinada em níveis considerados aceitáveis de exatidão e precisão (EURACHEM, 1998). Os mesmos critérios de limite de detecção podem ser adotados para o limite de quantificação, utilizando a relação 10:1; na relação baseada em parâmetros da curva analítica, substitui-se o valor 3,3 na equação por 10. Este fator de multiplicação também é sugerido pelo INMETRO (2007), envolvendo o desvio padrão das análises, feitas para quantificação do limite de detecção. O critério de aceitabilidade deve ser definido pelo analista. Comumente, para análises cromatográficas, emprega-se o método baseado nos

parâmetros da curva analítica, a qual deve conter a concentração correspondente ao limite de quantificação (RIBANI et al., 2004).

2.4.5 Faixa de aplicação

A faixa de trabalho é o intervalo de padrões em que os requisitos de precisão, exatidão e linearidade são satisfeitos. O limite inferior da faixa de trabalho deve coincidir com o limite de quantificação (INMETRO, 2007).

2.4.6 Exatidão

A exatidão é o grau de concordância entre a média de um conjunto de resultados obtidos experimentalmente e o valor verdadeiro ou reconhecido como tal. A exatidão indica a diferença entre o valor obtido e o valor real do analito na matriz, sendo geralmente expressa em termos de tendência (bias), ou seja, o desvio (positivo ou negativo) da média do valor obtido em relação ao valor real (EURACHEM, 1998).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI et al., 2004).

2.4.7 Precisão

A precisão é o grau de dispersão dos resultados, obtidos sob condições especificadas, em torno do valor médio. A precisão pode ser avaliada em condições de repetibilidade ou reprodutibilidade, sendo expressa em termos de coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (SOUZA & BRITO, 2002). Tanto a repetibilidade como a reprodutibilidade são, geralmente, dependentes da concentração do analito, e assim devem ser determinadas na faixa de concentrações estudada (EURACHEM, 1998).

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados obtidos por medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, em intervalos curtos de tempo. Ela representa a variabilidade obtida pelo mesmo analista, aplicando o mesmo método, no mesmo dia, sobre replicatas da mesma amostra (RIBANI et al., 2004).

Se a mesma amostra é analisada sob condições variadas, a medida de precisão recebe o nome de reprodutibilidade. Esta é definida como sendo o grau de concordância

entre os resultados obtidos pela aplicação de um mesmo procedimento analítico, ao mesmo material, sob condições preestabelecidas (como diferentes laboratórios, operadores, equipamentos) podendo ser avaliada parcialmente pela variação de um ou mais fatores. Experimentalmente, as medidas de precisão podem ser obtidas realizando-se um mínimo de 10 determinações independentes do analito em concentrações diferentes (EURACHEM, 1998) ou um mínimo de nove determinações (três concentrações diferentes/três replicatas cada concentração) independentes (ICH, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Amostras

Amostras de molhos de soja comerciais de sete marcas nacionais (A, B, C, D, E, F e G) foram adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, no período de julho de 2009 a fevereiro de 2010, tendo sido avaliados seis lotes de cada marca.

3.1.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados eram de grau analítico, exceto os solventes utilizados na CLAE (acetonitrila e metanol), que eram de grau cromatográfico. Estes solventes orgânicos foram filtrados em membranas HVLP, em PVDF, com especificações de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Toda a água utilizada era ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Os padrões das aminas bioativas histamina (HIM, dicloridrato), putrescina (PUT, dicloridrato), cadaverina (CAD, dicloridrato), tiramina (TIM, cloridrato), serotonina (SRT, cloridrato), agmatina (AGM, sal sulfato), espermidina (EPD, tricloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato) e triptamina (TRM, cloridrato) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O agente de derivação o-ftalaldeído (OPA) também foi adquirido da Sigma.

3.1.3 Soluções

Todas as soluções foram acondicionadas em tubos hermeticamente fechados, identificadas e armazenadas sob refrigeração para a realização das análises, exceto a solução tampão acetato de sódio:octanosulfonato de sódio, que foi mantida a 22 °C.

3.1.3.1 Solução padrão de dez aminas

Para o preparo da solução padrão de cada amina foi considerada a massa da base livre para resultar numa concentração de 1000 mg/L em ácido clorídrico 0,1 mol/L. A partir de alíquotas de 1 mL de cada uma das soluções individuais, obteve-se 10 mL de solução padrão numa concentração de 100 mg/L, contendo dez aminas.

3.1.3.2 Soluções padrão

A partir da solução de 100 mg/L contendo as dez aminas, em HCl 0,1 mol/L, foram feitas as diluições, neste ácido, até se obterem as concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; e 10,0 mg/L.

3.1.3.3 Solução tampão acetato de sódio:octanosulfonato de sódio

Como uma das fases móveis foi empregada a solução tampão de acetato de sódio 0,2 mol/L e octanosulfonato de sódio 15 mmol/L, com ajuste de pH para 4,9 em potenciômetro (Digimed, Brasil) por meio de ácido acético glacial. Esta solução foi filtrada em membrana HAWP em éster de celulose, com especificações de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore, Corp., Milford, MA, EUA) e desgaseificada em aparelho ultra-som (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil).

3.1.3.4 Solução derivante

A solução derivante foi preparada dissolvendo-se 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio em 500 mL de água ultrapura, cujo pH foi 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 previamente filtrado, 1,5 mL de Brij 35 e 1,5 mL de mercaptoetanol. A solução derivante foi preparada imediatamente antes do uso, desgaseificada em aparelho ultra-som (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil) e mantida sob abrigo da luz.

3.1.4 Vidraria

Toda a vidraria utilizada foi submetida à calibração por empresas devidamente autorizadas.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Otimização do método de extração de aminas bioativas em molho de soja

Para obtenção da melhor condição para extração das aminas bioativas em molho de soja foi utilizada uma estratégia seqüencial de planejamentos fatoriais. O primeiro planejamento foi um Plackett & Burman com 12 ensaios e 4 repetições no ponto central (RODRIGUES & IEMMA, 2005). As variáveis independentes estudadas foram o volume de amostra, o volume e a concentração do ácido tricloroacético (TCA), o tempo de agitação (a 250 rpm) e o tempo de centrifugação a 11250 x g (0 °C) (Tabela 5).

O uso do ácido tricloroacético foi preferido em relação ao ácido perclórico pelo fato do último ser explosivo.

Tabela 5. Primeiro planejamento experimental para otimização da extração das aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0*	+1
Volume de amostra (mL)	1	2	3
Volume de TCA (mL)	3	6	9
Concentração TCA(%)	1	5	9
Tempo de agitação (min)	2	4	6
Tempo de centrifugação (min)	0	5	10

* Ponto central.

Com base nos resultados do primeiro planejamento, foi proposto um segundo Plackett & Burman com 12 ensaios e 4 repetições no ponto central, alterando-se as faixas das variáveis volume de amostra e volume de TCA, mantendo-se as faixas das variáveis tempo de agitação e tempo de centrifugação e fixando a variável concentração do ácido em 5%, como pode ser observado na Tabela 6.

Por último, foi realizado um terceiro ensaio, fixando as variáveis volume de amostra e volume de TCA no nível +1 e alterando as variáveis tempo de agitação e tempo de centrifugação para condições que não haviam sido avaliadas nos planejamentos anteriores, como mostra a Tabela 7. Após a definição da condição ótima, foram realizados ensaios na condição otimizada para confirmar experimentalmente os resultados obtidos. Os resultados foram analisados no programa STATISTICA 8.0

(Statsoft, Tulsa, OK, EUA), adotando-se o nível de significância de 10%.

Tabela 6. Segundo planejamento experimental para otimização da extração das aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0*	+1
Volume de amostra (mL)	2	4	6
Volume de TCA (mL)	5	10	15
Tempo de agitação (min)	2	4	6
Tempo de centrifugação (min)	0	5	10

* Ponto central.

Tabela 7. Ensaios extras para otimização da extração das aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja

Tratamentos	Volume (mL)		Tempo (min)	
	Amostra	Ácido	Agitação	Centrifugação
1	6	15	2	0
2	6	15	4	0
3	6	15	2	5

3.2.2 Validação do método de determinação de aminas bioativas em molho de soja

A adequação do método de análise de aminas para o uso em molhos de soja foi determinada com base nos resultados dos parâmetros estabelecidos (linearidade, seletividade, efeitos de matriz, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação experimentais), considerando os critérios de aceitabilidade determinados, conforme sugerido por SOUZA (2007). O nível de significância adotado nos testes de hipótese foi $\alpha = 0,10$ para os testes de normalidade e de independência e de 0,05 para os demais testes. Os cálculos foram feitos em planilhas comerciais, cujos resultados foram previamente validados frente aqueles obtidos em diferentes *softwares* de análise estatística.

3.2.2.1 Linearidade

Com relação à linearidade foram realizados ensaios com soluções padrão com e sem interferência da matriz, utilizando área e altura dos picos (SOUZA et al., 2001). Para

a construção da curva padrão foi utilizada uma solução contendo padrão das dez aminas diluídas em HCl 0,1 mol/L com concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; e 10,0 mg/L, sendo que cada uma foi injetada três vezes (RONNING et al., 2006). Foi construído o gráfico da área do pico x concentração e, por regressão linear, foram determinados a equação da curva e o coeficiente de correlação. Para cada nível foram preparadas e analisadas três replicatas independentes, de forma aleatória.

Os parâmetros da regressão (interseção e inclinação) foram calculados pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) e os resíduos foram calculados por meio da diferença entre a concentração real e a concentração obtida pela regressão linear. Valores de resíduos dispersos foram diagnosticados e excluídos dos dados originais pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife. Esse método foi aplicado sucessivamente até que novos valores dispersos não fossem mais detectados, sendo a exclusão máxima de 22,2% do número de dados originais (HORWITZ, 1995). As premissas relativas à análise da regressão foram verificadas: normalidade (RYAN & JOINER, 1976), homocedasticidade (LEVENE, 1960; BROWN & FORSYTHE, 1974) e independência dos resíduos da regressão (DURBIN & WATSON, 1951). A análise de variância foi adotada para verificar a adequação do ajuste do modelo linear por meio da significância da regressão e do desvio da linearidade avaliado contra o erro puro.

3.2.2.2 Seletividade e efeito da matriz

Perfis cromatográficos da matriz adicionada da solução padrão de aminas foram comparados com o perfil cromatográfico das aminas em solvente para análise da seletividade. Duas curvas de calibração foram construídas, com níveis de concentração na faixa de 2,0 a 10,0 mg/L, sendo uma curva construída em solução HCl 0,1 mol/L e a outra utilizando a matriz molho de soja como solvente. As duas curvas foram construídas com três replicatas independentes em cada nível e analisadas em ordem aleatória na mesma batelada de experimentos.

Os parâmetros da regressão foram calculados e as premissas relativas ao MMQO avaliadas para as curvas. Uma vez confirmado o ajuste ao modelo linear, foi verificada a homogeneidade ou heterocedasticidade entre as variâncias dos resíduos das curvas pelo teste de F (SOUZA, 2007). A inclinação e a interseção obtidas para a curva do solvente foram comparadas, pelo teste de t, com a inclinação e interseção estimadas para a curva na matriz, utilizando variâncias combinadas em caso de homogeneidade e

variâncias distintas em caso de heterocedasticidade entre as variâncias dos resíduos das curvas.

3.2.2.3 Exatidão, precisão e limites

Para determinação da exatidão e da precisão, foi utilizada como matriz uma amostra comercial que continha o menor teor de aminas bioativas. Essa amostra foi injetada dez vezes para determinar o perfil exato da mesma. A exatidão, a precisão (sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial) e os limites de quantificação experimentais foram estabelecidos por ensaios com as amostras descritas acima e amostras adicionadas em níveis correspondentes a 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg/L, em pelo menos nove replicatas independentes de cada nível. As amostras foram divididas em três lotes, os quais foram analisados em três dias diferentes por três analistas diferentes. Considerando os resultados dos testes de efeito da matriz, curvas na matriz foram preparadas para calcular as concentrações das aminas nas amostras.

Os valores dispersos foram investigados nos resultados de recuperação aparente obtidos para cada nível de concentração pelo teste de Grubbs (GRUBBS, 1969; BARET & LEWIS, 1994; BURKE, 2001). Após a eliminação do valor disperso, o teste de Grubbs foi aplicado sucessivamente até que novos valores não fossem detectados ou até a exclusão máxima de 22,2% no número original de resultados (HORWITZ, 1995).

A exatidão foi investigada por meio da recuperação aparente obtida para as nove replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração. Os critérios adotados para considerar os resultados satisfatórios foram recuperações de 80 a 110%, uma vez que as concentrações estudadas eram maiores que 10 µg/kg (EC, 2002).

A precisão, sob condição de repetitividade e de reprodutibilidade parcial, foi expressa em termos de desvio padrão relativo de repetitividade e de reprodutibilidade (DPR_r e DPR_R , respectivamente) obtida para as replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração. O DPR_r foi considerado aceitável quando estivesse dentro de dois terços (EC, 2002) do DPR_R calculado pela equação de HORWITZ (1982) modificado por THOMPSON (2000). Os desvios máximos aceitáveis para cada nível de concentração, estimados pela equação de THOMPSON (2000), estão descritos na Tabela 8.

O limite de quantificação experimental foi estabelecido como a menor concentração na qual o método pode operar com exatidão e precisão aceitáveis.

Como não estavam disponíveis amostras brancas (ou seja, sem a presença de aminas), para a determinação do limite de detecção, foram injetadas vinte vezes alíquotas da solução padrão de aminas na concentração de 0,2 mg/L (valor mais baixo da curva padrão do método de detecção de aminas para as condições utilizadas). O limite de detecção foi calculado como sendo a média das concentrações da amina obtida para a solução injetada adicionada de três vezes o desvio padrão das médias (INMETRO, 2007).

Tabela 8. Critérios de aceitabilidade do desvio padrão relativo (DPR) para cada nível de concentração

Concentração (mg/L)	DPR _r (%)	DPR _R (%)
2,0	9,6	14,4
4,0	8,7	13,0
6,0	8,1	12,2
8,0	7,8	11,7
10,0	7,5	11,3

Fonte: THOMPSON (2000).

DPR_r: desvio padrão relativo sob condições de repetibilidade.

DPR_R: desvio padrão relativo sob condições de reprodutibilidade.

3.2.3 Análise de aminas bioativas em molhos de soja coletados no mercado de Belo Horizonte/MG

Após a validação da metodologia foram analisadas amostras de molho de soja do mercado de Belo Horizonte, MG para avaliação do perfil e dos teores de aminas bioativas usando o método desenvolvido.

Alíquotas de 6 mL de molho de soja foram adicionadas de 15 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% e agitadas por 4 minutos em mesa agitadora a 250 rpm. Após agitação, as amostras foram filtradas em papel Whatman N° 1 e em seguida foram filtradas em membrana HAWP de éster de celulose, com especificações de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore, Corp., Milford, MA, EUA), para posterior injeção e análise em CLAE por pareamento de íons em coluna de fase reversa, com quantificação por fluorimetria após derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído (VALE & GLÓRIA, 1997). Para a separação das aminas foram empregadas como fases móveis acetonitrila (fase B) e solução tampão acetato de sódio-octanossulfonato de sódio (fase A), utilizando o gradiente de eluição apresentado na Tabela 9 (MANFROI et al., 2009).

Para a realização da análise cromatográfica, foi utilizado um cromatógrafo

Shimadzu (Kioto, Japão), nas condições cromatográficas abaixo, constituído por:

- três bombas com conjunto de lavagem automática do pistão, sendo duas modelo LC-10 AD e uma LC-10 ADvp acoplada a uma câmara de mistura,
- injetor automático modelo SIL-10 ADvp,
- detector de fluorescência modelo RF-10AXL, com comprimentos de onda de 340 e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente,
- unidade de controle CBM-20 A conectada a um microcomputador e a todos os módulos
- forno CTO-10ASvp - temperatura 22 °C
- coluna Nova-Pak C₁₈ de fase reversa (3,9 x 300 mm, 4 µm) e pré-coluna µBondapak (Waters, Milford, MA, EUA)
- fluxo total - 0,8 mL/min
- fluxo derivante - 0,3 mL/min.

Tabela 9. Gradiente de eluição para as fases móveis acetonitrila e solução tampão acetato de sódio:octanosulfonato de sódio utilizado na determinação das aminas

Tempo (min)	Solução tampão (%)	Acetonitrila (%)
0	85	15
1	94	6
14	94	6
16	74	26
22	84	16
25	84	16
26	67	33
27	82	18
29	82	18
30	62	38
31,5	85	15
68	85	15

Fonte: MANFROI et al. (2009).

As condições cromatográficas utilizadas foram baseadas em SILVA (2008). Na Figura 8 está disposto um esquema representativo da análise por CLAE com derivação pós-coluna e detecção por fluorescência. A derivação pós-coluna foi realizada por meio

de uma câmara de mistura instalada após a saída da coluna em um tubo de teflon de 2 m de comprimento conectando a câmara ao detector de fluorescência.

A identificação das aminos foi feita por comparação entre o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com os das aminos da solução padrão em HCl 0,1 mol/L. As soluções padrão foram analisadas intercaladas às amostras. No caso de dúvida quanto aos picos correspondentes à determinada amina, a confirmação foi feita por meio da adição de quantidade conhecida de solução padrão da amina à amostra.

A quantificação das aminos foi realizada por interpolação em curva analítica na matriz (construída com a amostra de menor teor de aminos bioativas) e o valor encontrado na amostra multiplicado pelo fator de correção correspondente à amina.

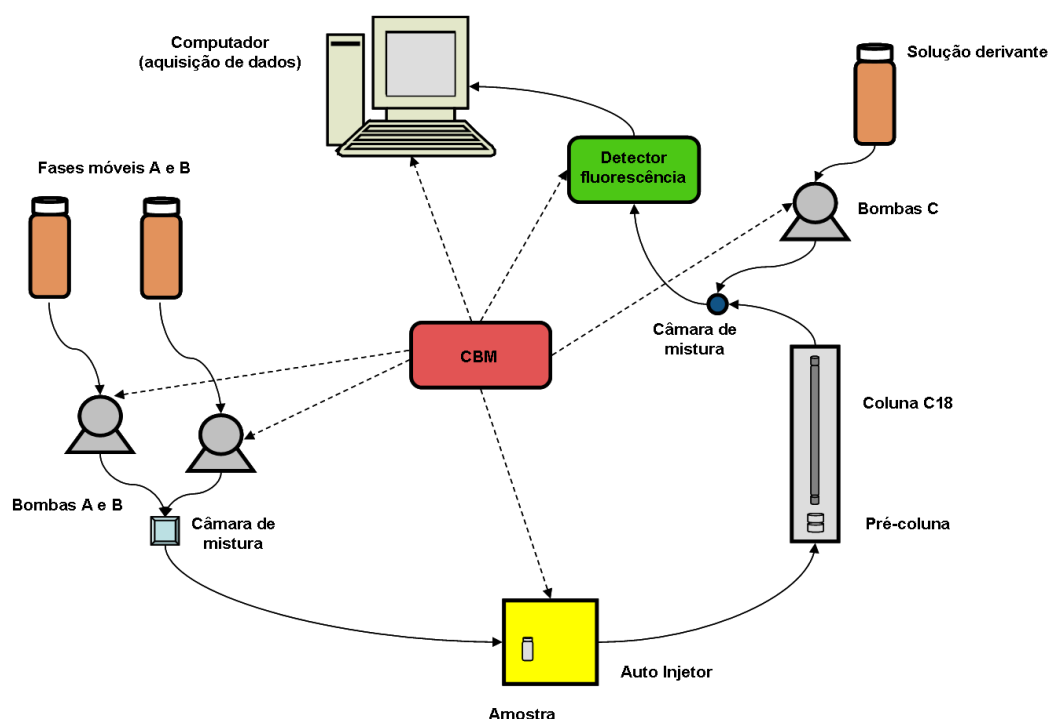


Figura 8. Sistema CLAE com derivação pós-coluna e detector de fluorescência utilizado na análise das aminos bioativas (SILVA, 2008).

3.2.4 Análises físico-químicas dos molhos de soja coletados no mercado de Belo Horizonte/MG

As amostras de molhos de soja foram também submetidas a análises físico-químicas de pH, acidez e teor de sólidos solúveis.

3.2.4.1 Determinação de pH e acidez

As análises de pH foram realizadas utilizando-se potenciômetro (Digimed DM20, São Paulo, Brasil) calibrado com os padrões de pH 4,0 e 7,0. As análises de acidez

foram realizadas titulando-se 10 mL da amostra com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 mol/L, sendo os resultados expressos em meq/L de amostra (IAL, 2005).

3.2.4.2 Determinação de sólidos solúveis (° Brix)

O teor de sólidos solúveis foi determinado diretamente em refratômetro, sendo a resposta expressa em ° Brix (IAL, 2005) a 25 °C.

3.2.5 Correlação entre os teores de aminos bioativas em molho de soja com as características físico-químicas

Após análise dos teores de aminos bioativas nos molhos de soja do mercado de Belo Horizonte, foi avaliada a correlação entre estes teores e as características físico-químicas dos mesmos e entre as aminos, através da correlação de Pearson a 95% de confiança.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os métodos utilizados para o tratamento estatístico dos resultados foram a análise de variância (ANOVA fator único) e o teste de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 2000). Os dados da otimização foram analisados no programa STATISTICA 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS EM MOLHO DE SOJA

Para a otimização da extração de aminos bioativas em molho de soja foi realizada uma sequência de planejamentos. O primeiro foi um planejamento Plackett & Burman com 12 ensaios e 4 repetições no ponto central. As variáveis independentes estudadas foram o volume de amostra, o volume e a concentração do ácido tricloroacético (TCA), o tempo de agitação e o tempo de centrifugação. Como respostas, foram avaliadas as porcentagens de recuperação de putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina, que são as aminos encontradas em maior quantidade em molho de soja.

Na Tabela 10 estão expressos os níveis estudados para cada variável independente e os resultados deste planejamento. As porcentagens de recuperação variaram de 46,1 a 85,6% para a putrescina, de 36,9 a 75,6% para a cadaverina, de 52,1 a 85,9% para a histamina, de 53,1 a 78,9% para a tiramina, e de 54,7 a 88,8% para a feniletilamina. Estes valores não estão dentro da faixa aceitável de recuperação, que seria de 80 a 110% (EC, 2002), sendo necessária a realização de um segundo planejamento.

Na Tabela 11 estão descritos os efeitos padronizados, bem como os desvios padrão e os valores de t e p para as variáveis principais. As variáveis estatisticamente significativas, a 10% de probabilidade, para a putrescina foram o volume de TCA e o tempo de agitação; para cadaverina, tiramina e feniletilamina foram o volume de amostra, o volume e a concentração do TCA e o tempo de agitação; para a histamina foram o volume de amostra, o volume e a concentração de TCA e o tempo de centrifugação. Analisando os efeitos padronizados para as variáveis, pode-se perceber que o volume de amostra e o volume de ácido exerceram um efeito positivo na variável de resposta, ou seja, um aumento nos volumes de amostra e de TCA acarretaram um aumento na porcentagem de recuperação das aminos estudadas, exceto para a cadaverina, para a qual um aumento no volume de amostra diminuiu a resposta. O efeito padronizado para a variável tempo de agitação indicou um efeito negativo sobre a variável de resposta, indicando que este deve ser diminuído. Pelo fato do TCA ser usado mais comumente para a extração de aminos na concentração de 5%, optou-se por fixar o mesmo nessa concentração no segundo delineamento.

Tabela 10. Matriz do primeiro planejamento experimental realizado para otimização da extração de aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja

Tratamentos	Volume amostra (mL)	Ácido TCA		Tempo (min)		Percentual de recuperação (%)				
		Volume (mL)	Concentração (%)	Agitação	Centrifugação	PUT	CAD	HIM	TIM	FEM
1	3	3	9	2	0	55,3	37,4	75,6	76,7	79,6
2	3	9	1	6	0	73,3	60,3	84,2	76,9	85,6
3	1	9	9	2	10	85,6	75,6	82,0	75,1	84,5
4	3	3	9	6	0	51,8	36,9	74,0	70,7	73,1
5	3	9	1	6	10	71,5	60,2	80,7	75,6	83,5
6	3	9	9	2	10	73,8	68,7	80,4	78,9	88,8
7	1	9	9	6	0	79,6	73,7	85,9	70,1	80,4
8	1	3	9	6	10	46,1	44,0	52,1	53,1	55,2
9	1	3	1	6	10	47,5	43,1	53,0	53,4	54,7
10	3	3	1	2	10	57,3	38,9	69,4	69,9	72,0
11	1	9	1	2	0	77,1	69,9	75,9	68,2	75,8
12	1	3	1	2	0	52,4	47,7	59,2	57,4	60,8
13	2	6	5	4	5	67,8	63,1	72,6	72,7	75,1
14	2	6	5	4	5	68,2	62,7	72,3	72,8	77,5
15	2	6	5	4	5	68,3	63,4	70,9	72,9	79,2
16	2	6	5	4	5	68,2	62,4	73,4	71,8	78,5

PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; FEM – feniletilamina.

sugerindo que este tempo deve ser diminuído. Porém, optou-se por manter a mesma faixa de estudo no segundo delineamento.

Tabela 11. Efeitos padronizados, desvios padrão, valores de t e probabilidade das variáveis independentes do primeiro planejamento fatorial para otimização da extração das aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja

Aminas		Efeitos padronizados	Desvios padrão	t(9)	p*
Putrescina	Média	64,27	1,07	59,950	0,000
	Curvatura	7,73	4,29	1,800	0,105
	Volume de amostra	-0,85	2,14	-0,390	0,703
	Volume de ácido	25,08	2,14	11,700	0,000
	Concentração do ácido	2,19	2,14	1,020	0,334
	Tempo de Agitação	-5,29	2,14	-2,470	0,036
	Tempo de Centrifugação	-1,29	2,14	-0,600	0,563
Cadaverina	Média	54,69	0,51	106,917	0,000
	Curvatura	16,40	2,05	8,015	0,000
	Volume de amostra	-8,61	1,02	-8,414	0,000
	Volume de ácido	26,75	1,02	26,147	0,000
	Concentração do ácido	2,72	1,02	2,662	0,026
	Tempo de Agitação	-3,34	1,02	-3,262	0,010
	Tempo de Centrifugação	0,78	1,02	0,759	0,467
Histamina	Média	72,71	1,21	60,079	0,000
	Curvatura	-0,84	4,84	-0,173	0,866
	Volume de amostra	9,37	2,42	3,871	0,004
	Volume de ácido	17,63	2,42	7,283	0,000
	Concentração do ácido	4,61	2,42	1,905	0,089
	Tempo de Agitação	-2,09	2,42	-0,862	0,411
	Tempo de Centrifugação	-6,19	2,42	-2,559	0,031
Tiramina	Média	68,84	0,72	95,717	0,000
	Curvatura	7,46	2,88	2,595	0,029
	Volume de amostra	11,89	1,44	8,266	0,000
	Volume de ácido	10,63	1,44	7,389	0,000
	Concentração do ácido	3,87	1,44	2,689	0,025
	Tempo de Agitação	-4,38	1,44	-3,043	0,014
	Tempo de Centrifugação	-2,32	1,44	-1,613	0,141
Feniletilamina	Média	74,49	0,79	94,316	0,000
	Curvatura	6,15	3,16	1,945	0,084
	Volume de amostra	11,87	1,58	7,513	0,000
	Volume de ácido	17,18	1,58	10,878	0,000
	Concentração do ácido	4,87	1,58	3,080	0,013
	Tempo de Agitação	-4,79	1,58	-3,031	0,014
	Tempo de Centrifugação	-2,75	1,58	-1,742	0,116

* Valores em negrito e sublinhados são significativos a 10% de probabilidade.

Um segundo planejamento Plackett & Burman com 12 ensaios e quatro repetições no ponto central foi realizado alterando-se as faixas das variáveis volume de amostra e volume de TCA, mantendo-se as faixas das variáveis tempo de agitação e tempo de centrifugação e fixando a variável concentração do TCA em 5%, como pode ser observado na Tabela 12. A porcentagem de recuperação variou no segundo planejamento de 50,7 a 122,0% para a putrescina, de 75,8 a 103,1% para a cadaverina, de 60,0 a 80,2% para a histamina, de 76,4 a 90,3% para a tiramina e de 68,8 a 103,3% para a feniletilamina.

Na Tabela 13 estão descritos os efeitos padronizados, bem como os desvios padrão e os valores de t e p para as variáveis principais. As variáveis estatisticamente significativas, a 10% de probabilidade, para a putrescina foi o volume de TCA; para a histamina e feniletilamina foram o volume de amostra e o volume de TCA; para tiramina foram o volume de amostra e o tempo de centrifugação; e para a cadaverina nenhuma variável foi estatisticamente significativa. Analisando os efeitos padronizados para as variáveis, pode-se perceber que as variáveis volume de amostra e volume de ácido possuem um efeito positivo na variável de resposta, ou seja, um aumento no volume de amostra e no volume de ácido acarretariam um aumento na porcentagem de recuperação das aminas estudadas, como já era esperado. A variável tempo de centrifugação foi estatisticamente significativa somente para a tiramina, indicando um efeito negativo sobre a variável de resposta, ou seja, indicando que deve ser diminuída, optando-se por não centrifugar a amostra.

Após o segundo planejamento ainda não havia sido atingida a faixa de porcentagem de recuperação desejada (80 a 110%) para todas as aminas estudadas. O tratamento 3, apesar de apresentar valores de recuperação na faixa desejada, apresentou valores de recuperação de histamina e de tiramina, que são as aminas de maior interesse em molho de soja, bem próximo ao limite inferior. Portanto, para encontrar a condição ótima de extração das aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja, foram analisados os efeitos padronizados sobre as variáveis do segundo planejamento e quais condições ainda não tinham sido realizadas e que poderiam aumentar a porcentagem de recuperação.

As condições analisadas estão descritas na Tabela 14, bem como a porcentagem de recuperação. Nessas condições, a faixa de porcentagem de recuperação desejada para as aminas de interesse foi obtida. Realizando o teste de Tukey para comparação das médias, concluiu-se que houve diferença significativa, a 5% de probabilidade, entre as médias dos tratamentos 2 e 3 apenas para FEM, sendo que o tratamento 2 apresentou

a maior média. Observa-se que a porcentagem de recuperação para as amins histamina e tiramina também aumentou. Portanto, foi escolhido o segundo tratamento como sendo a condição ótima: 6 mL de amostra, 15 mL de TCA, 4 minutos de agitação e não necessidade de centrifugação.

Tabela 12. Matriz do segundo planejamento experimental realizado para otimização da extração das aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja

Tratamentos	Volume (mL)		Tempo (min)		Percentual de recuperação (%)				
	Amostra	Ácido	Agitação	Centrifugação	PUT	CAD	HIM	TIM	FEM
1	6	5	2	0	60,5	86,9	77,0	88,8	94,5
2	6	15	6	10	122,0	103,1	77,3	87,2	103,3
3	2	15	2	0	84,9	92,4	80,2	81,5	102,3
4	6	5	6	10	50,7	75,8	72,9	81,8	88,3
5	6	15	6	10	121,9	102,9	77,0	85,1	101,4
6	6	15	2	0	114,1	101,8	75,4	86,2	82,5
7	2	15	6	10	82,3	87,9	75,3	78,0	97,9
8	2	5	6	10	105,9	97,5	62,8	76,4	70,2
9	2	5	6	10	100,4	101,1	62,0	78,0	68,8
10	6	5	2	0	54,9	89,5	72,7	90,3	81,2
11	2	15	2	0	81,3	87,1	76,1	80,2	84,3
12	2	5	2	0	101,2	96,6	60,0	76,7	70,6
13	4	10	4	5	97,8	94,9	64,8	79,4	72,7
14	4	10	4	5	104,9	95,4	67,5	79,7	74,3
15	4	10	4	5	108,3	97,8	70,1	81,8	75,5
16	4	10	4	5	104,5	97,8	66,3	79,2	73,4

PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; FEM – feniletilamina.

Tabela 13. Efeitos padronizados, desvios padrão, valores de t e probabilidade das variáveis independentes do segundo planejamento fatorial para otimização da extração das aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja

Amina		Efeitos padronizados	Desvios padrão	t(10)	p*
Putrescina	Média	90,00	5,93	15,176	<u>0,000</u>
	Curvatura	27,74	23,72	1,170	0,269
	Volume de amostra	-5,32	11,86	-0,448	0,663
	Volume de ácido	22,16	11,86	1,869	<u>0,091</u>
	Tempo de agitação	-13,91	11,86	-1,172	0,268
	Tempo de centrifugação	14,39	11,86	1,213	0,253
Cadaverina	Média	93,54	2,21	42,375	<u>0,000</u>
	Curvatura	5,87	8,83	0,665	0,521
	Volume de amostra	-0,42	4,41	-0,096	0,925
	Volume de ácido	4,61	4,41	1,044	0,321
	Tempo de agitação	-6,31	4,41	-1,430	0,183
	Tempo de centrifugação	2,34	4,41	0,530	0,608
Histamina	Média	72,38	1,06	68,434	<u>0,000</u>
	Curvatura	-10,44	4,23	-2,469	<u>0,033</u>
	Volume de amostra	5,97	2,12	2,821	<u>0,018</u>
	Volume de ácido	9,00	2,12	4,256	<u>0,002</u>
	Tempo de agitação	3,09	2,12	1,459	0,175
	Tempo de centrifugação	-2,37	2,12	-1,121	0,289
Tiramina	Média	82,52	0,57	144,512	<u>0,000</u>
	Curvatura	-4,98	2,28	-2,179	0,054
	Volume de amostra	8,12	1,14	7,106	<u>0,000</u>
	Volume de ácido	1,04	1,14	0,906	0,386
	Tempo de agitação	-0,79	1,14	-0,693	0,504
	Tempo de centrifugação	-2,84	1,14	-2,488	<u>0,032</u>
Feniletilamina	Média	87,10	2,39	36,458	<u>0,000</u>
	Curvatura	-26,28	9,56	-2,750	<u>0,021</u>
	Volume de amostra	9,54	4,78	1,996	<u>0,074</u>
	Volume de ácido	16,36	4,78	3,423	<u>0,007</u>
	Tempo de agitação	4,33	4,78	0,907	0,386
	Tempo de centrifugação	2,42	4,78	0,507	0,623

* Valores em negrito e sublinhados são significativos a 10% de probabilidade.

Tabela 14. Porcentagem de recuperação na extração das aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja

Tratamentos	Volume (mL)		Tempo (min)		Porcentagem de recuperação (%)				
	Amostra	Ácido	Agitação	Centrifugação	PUT	CAD	HIM	TIM	FEM
1	6	15	2	0	88,4 ^a	94,5 ^a	93,4 ^a	89,6 ^a	79,0 ^a
2	6	15	4	0	94,6 ^a	99,4 ^a	97,1 ^a	90,7 ^a	84,6 ^b
3	6	15	2	5	91,0 ^a	95,8 ^a	91,4 ^a	84,7 ^a	82,7 ^{a,b}

Valores médios de triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância (teste de Tukey).
 PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; FEM – feniletilamina.

4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS EM MOLHO DE SOJA

4.2.1 Linearidade

Os gráficos exploratórios dos resíduos da regressão após tratamento dos valores dispersos pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife estão apresentados na Figura 9.

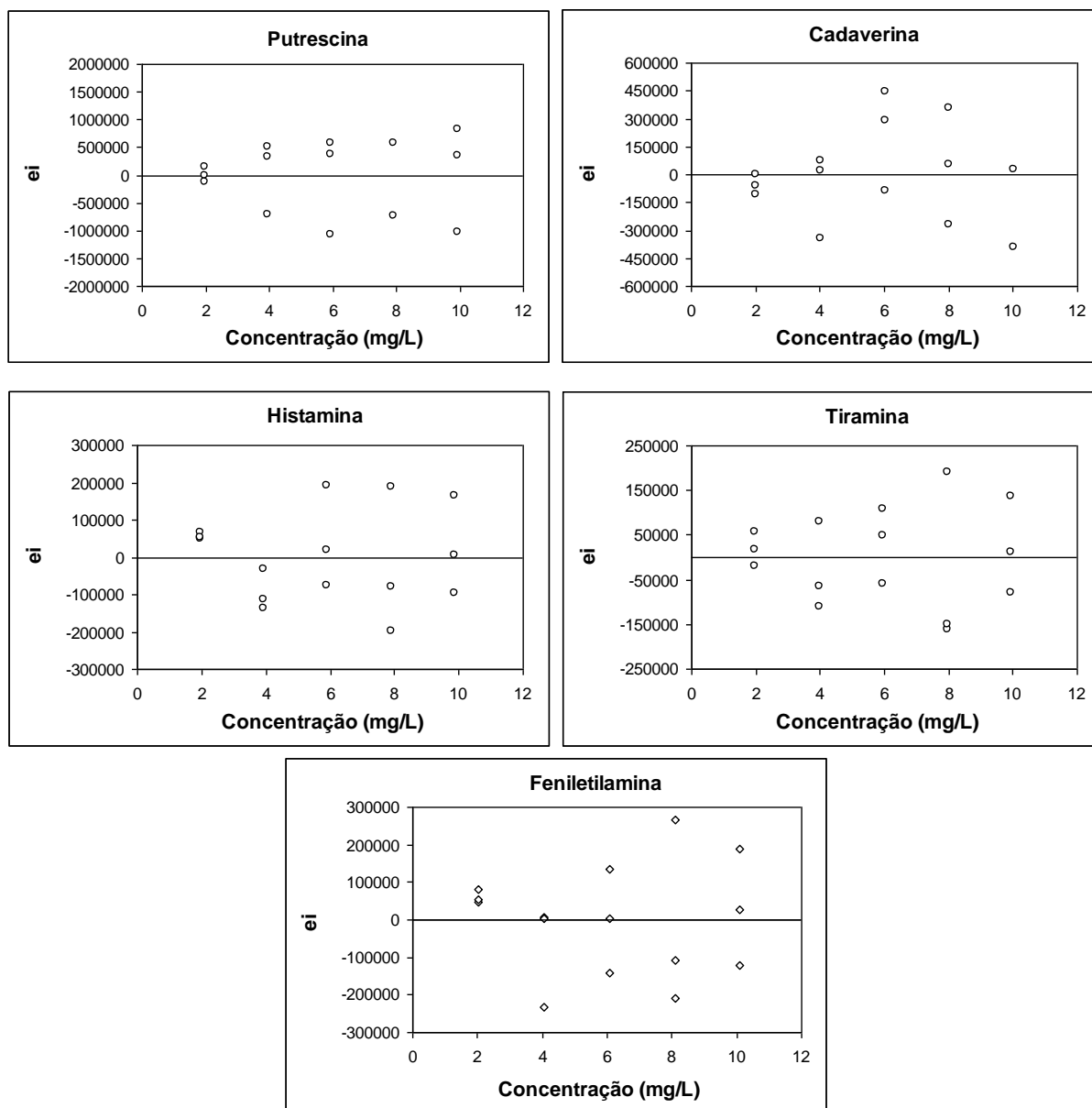


Figura 9. Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas das aminas analisadas em solvente (e_i = resíduo da regressão).

Em nenhum dos casos foram observados mais do que três valores dispersos, correspondentes ao limite máximo de pontos passíveis de serem removidos, ou seja, 22,2% dos quinze dados originais. Os resíduos da regressão foram calculados por meio da diferença entre a concentração real e a concentração obtida pela equação da reta. A análise visual dos gráficos de resíduos demonstrou que não houve tendências óbvias na distribuição dos resíduos.

As premissas de que os resíduos da regressão seguiram distribuição normal, são homocedásticos e independentes foram confirmadas, garantindo a aplicação dos testes de hipóteses F, para estimativa da significância da regressão e do desvio de linearidade (Tabela 15). Os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner indicaram que os desvios da normalidade não foram significativos ($p > 0,10$). A variância dos erros ao longo dos níveis de concentração estimada pelo teste de Levene modificado também não foi significativa ($p > 0,05$), sugerindo homocedasticidade. A estatística de Durbin-Watson demonstrou independência dos resíduos ($p > 0,10$).

Tabela 15. Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para as curvas das aminas bioativas

Estatística	Aminas				
	PUT	CAD	HIM	TIM	FEM
<i>Número de observações</i>					
<i>n</i>	14	14	15	15	15
<i>Normalidade</i>					
<i>R</i>	0,950	0,981	0,983	0,994	0,987
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Homocedasticidade</i>					
<i>t_L</i>	0,856	0,597	1,113	2,164	1,632
<i>p</i>	0,409	0,562	0,286	0,050	0,127
<i>Independência</i>					
<i>d</i>	2,854	1,767	2,147	2,409	2,411
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Regressão</i>					
<i>F</i>	2225,09	7141,86	8547,13	6640,12	6822,74
<i>p</i>	$5,39 \times 10^{-15}$	$5,03 \times 10^{-18}$	$1,04 \times 10^{-19}$	$5,35 \times 10^{-19}$	$4,48 \times 10^{-19}$
<i>Desvio da Linearidade</i>					
<i>F</i>	0,019	1,321	0,994	0,329	0,428
<i>p</i>	0,996	0,327	0,435	0,805	0,737

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *t_L* = estatística t de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão de variâncias.

PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; FEM – feniletilamina.

Os dados obtidos foram avaliados como sendo bem ajustados ao modelo linear. Regressão significativa ($p < 0,001$) e desvios da linearidade não significativos ($p > 0,05$) indicaram que a faixa de 2,0 a 10,0 mg/L foi linear para as amins analisadas. As curvas de solvente com as respectivas equações e coeficientes de determinação estão apresentadas na Figura 10.

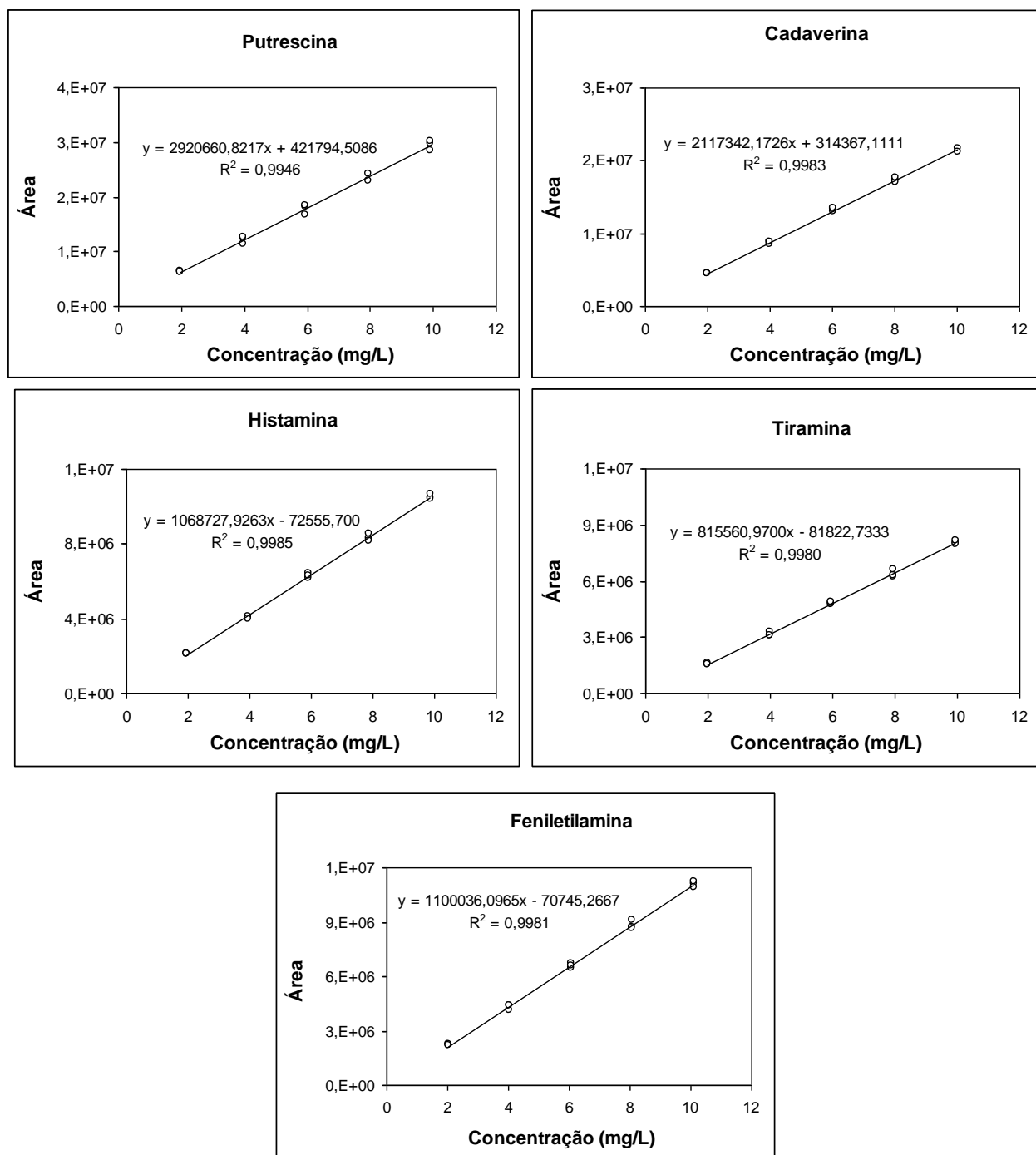


Figura 10. Curvas de calibração das amins em solvente, na faixa de 2,0 a 10,0 mg/L, com as respectivas equações e coeficientes de determinação (y = resposta em área dos picos, x = concentração da amina em mg/L, R^2 = coeficiente de determinação).

4.2.2 Seletividade e efeito de matriz

O cromatograma típico obtido para a solução padrão de aminos e para a amostra de molho de soja adicionada de padrão encontra-se disposto na Figura 11, indicando a seletividade do método. No molho de soja usado nesta etapa (amostra comercial com menor teor de aminos bioativas) estavam presentes as aminos putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e espermidina. Os picos apresentaram boa separação e os mesmos tempos de retenção, independente de estarem ou não na presença da matriz. A resolução dos picos indicou a capacidade do método em determinar as dez aminos, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, espermidina, feniletilamina, espermina e triptamina, sem interferentes mútuos. A indisponibilidade de amostras brancas (ou seja, sem a presença de aminos) e o fato da técnica para a análise de aminos em questão envolver a separação de multielementos similares foram justificativas consideradas suficientes para determinação da seletividade.

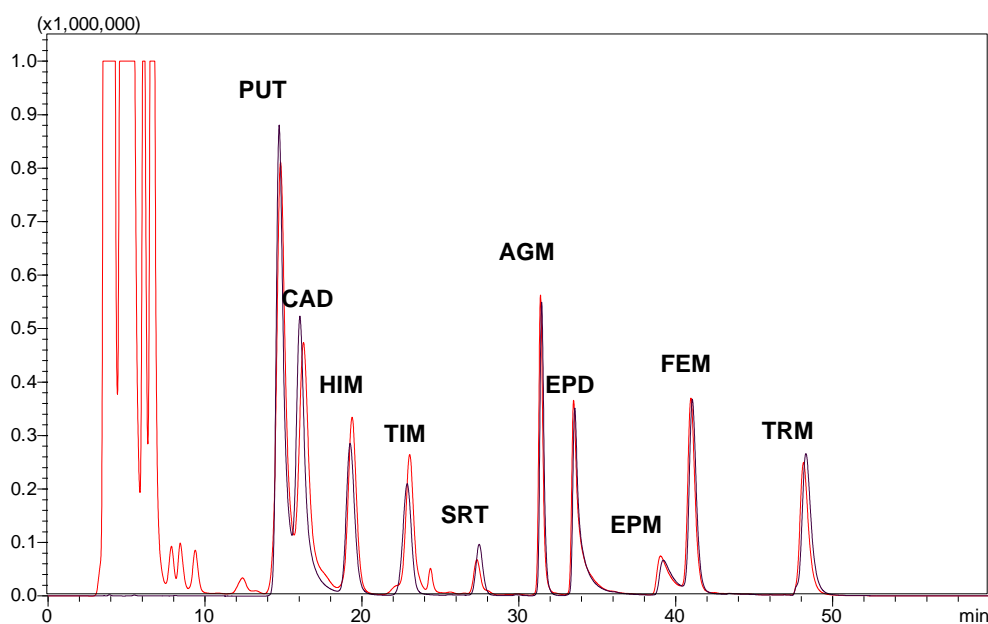


Figura 11. Cromatograma da solução padrão das dez aminos no solvente (—) e da matriz molho de soja adicionada (---), na concentração de 10,0 mg/L. (PUT - putrescina; CAD - cadaverina; HIM - histamina; TIM - tiramina; SRT - serotonina; AGM - agmatina; EPD - espermidina; EPM - espermina; FEM - feniletilamina; TRM - triptamina.) CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com OPA e detecção por fluorescência (340 e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente); coluna Nova-Pak C₁₈ de fase reversa (3,9 x 300 mm, 4 μm) e pré-coluna μBondapak.

As curvas de calibração das aminos foram construídas utilizando-se a matriz molho de soja como solvente. Os valores extremos foram tratados e todas as premissas relativas ao MMQO (normalidade, homocedasticidade e independência) foram

confirmadas para as curvas construídas na matriz relativas às aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina. A significância da regressão e os desvios de linearidade não significativos confirmaram o modelo linear e indicaram a possibilidade de comparação das inclinações e interseções pelo teste de t para avaliação do efeito da matriz (Tabela 16). As curvas de calibração das aminas construídas na matriz molho de soja estão apresentadas na Figura 12. As curvas no solvente (dados apresentados na linearidade) e na matriz foram analisadas simultaneamente para evitar que efeitos temporais fossem interpretados como diferenças devido à matriz.

O teste de F indicou homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas no solvente e matriz para as cinco aminas analisadas, possibilitando o uso do teste de t com variâncias combinadas para avaliação do efeito da matriz.

Tabela 16. Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para as curvas das aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina construídas em molho de soja

Estatística	Aminas				
	PUT	CAD	HIM	TIM	FEM
<i>Número de observações</i>					
<i>n</i>	14	13	13	15	14
<i>Normalidade</i>					
<i>R</i>	0,9884	0,9509	0,9839	0,9673	0,9854
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Homocedasticidade</i>					
<i>t_L</i>	0,831	0,128	1,195	1,171	0,205
<i>p</i>	0,422395	0,900128	0,257222	0,262776	0,841072
<i>Independência</i>					
<i>d</i>	2,243	2,325	2,074	2,411	2,061
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Regressão</i>					
<i>F</i>	4163,09	4282,40	8278,58	3149,47	8728,71
<i>p</i>	$1,27 \times 10^{-16}$	$1,32 \times 10^{-15}$	$3,53 \times 10^{-17}$	$6,73 \times 10^{-17}$	$1,51 \times 10^{-18}$
<i>Desvio da Linearidade</i>					
<i>F</i>	3,144	2,452	1,169	0,169	4,492
<i>p</i>	0,0795	0,138	0,380	0,915	0,0345

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *t_L* = estatística t de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão de variâncias. PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; FEM – feniletilamina.

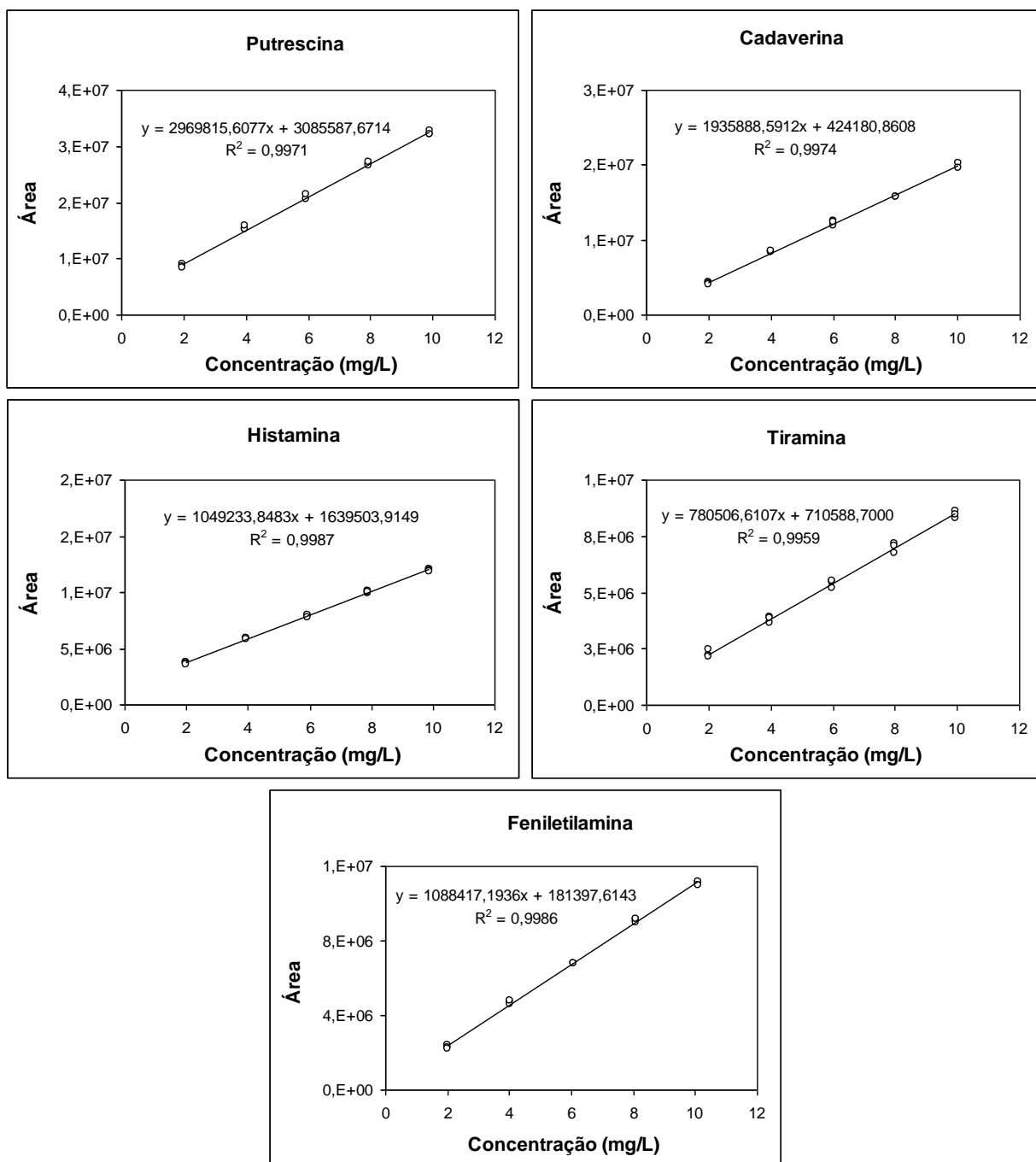


Figura 12. Curvas de calibração das aminas na matriz molho de soja, na faixa de 2,0 a 10,0 mg/L, com as respectivas equações e coeficientes de determinação. (y = resposta em área dos picos, x = concentração da amina em mg/L, R^2 = coeficiente de determinação).

Na Tabela 17 estão expostos os resultados das comparações das inclinações e interseções das curvas de calibração construídas no solvente e na matriz. Houve diferença significativa, a 5% de probabilidade, entre as interseções das duas curvas para as aminas putrescina, histamina, tiramina e feniletilamina. A inclinação foi significativamente diferente, a 5% de probabilidade, entre as duas curvas para a cadaverina. Com base nesses resultados, foi possível inferir que houve um efeito da

matriz, ou seja, as curvas das aminas estudadas no solvente não forneceram as mesmas respostas que as amostras de molho de soja contendo essas aminas nas mesmas faixas de concentração estudadas, como mostra também a Figura 13. Portanto, para construção da curva padrão, deve-se utilizar a matriz e não o solvente.

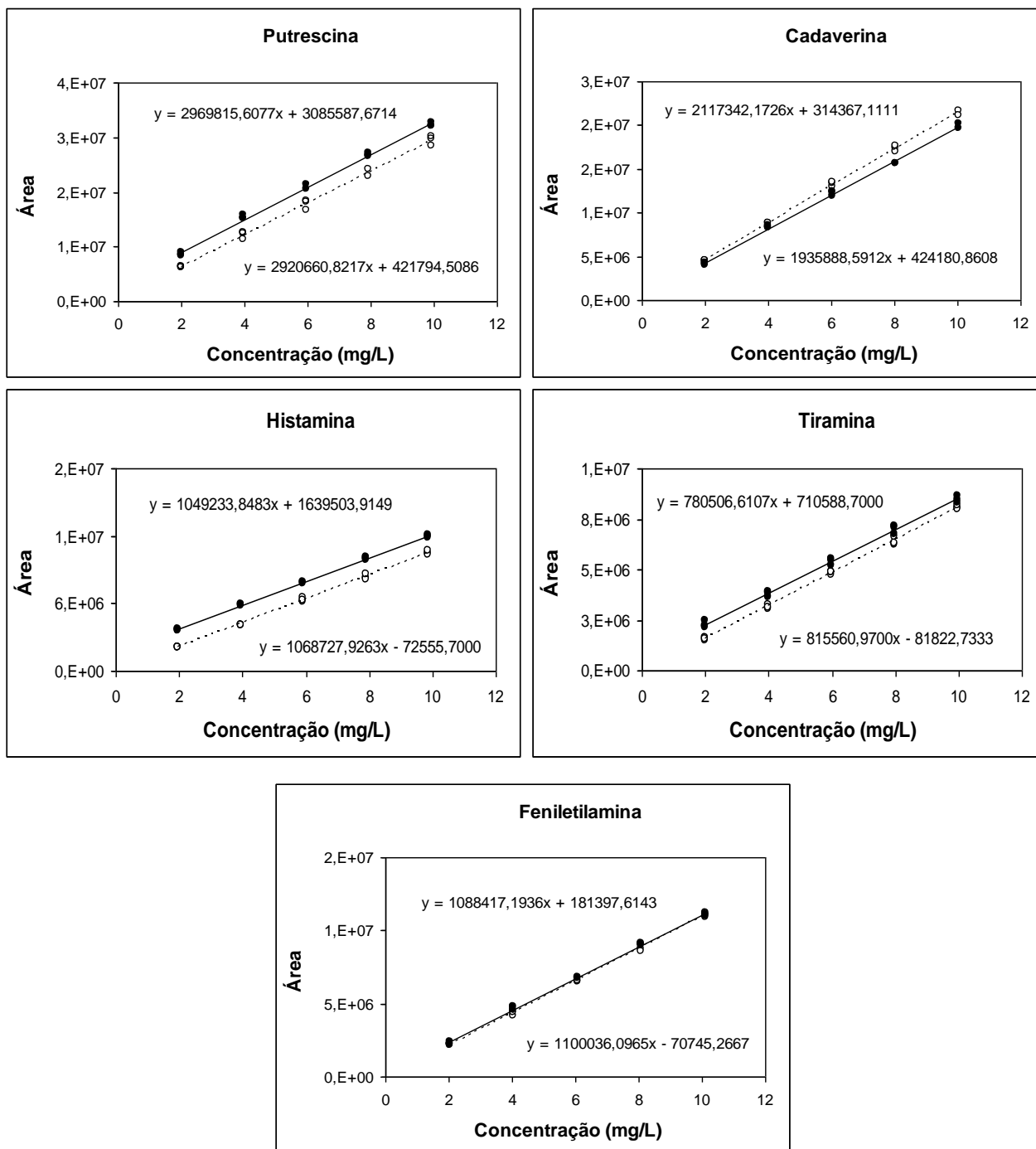


Figura 13. Curvas de calibração das aminas no solvente (---) e na matriz molho de soja (—), na faixa de 2,0 a 10,0 mg/L.

Tabela 17. Comparação entre as interseções e inclinações das curvas de calibração na matriz molho de soja com as curvas no solvente para as aminas na faixa de 2,0 a 10,0 mg/L

Estatística	Aminas				
	PUT	CAD	HIM	TIM	FEM
<i>Comparação entre as interseções</i>					
t_a	4,876	0,453	15,753	6,487	2,113
p	<<0,05	0,654	<<0,05	<<0,05	<<0,05
<i>Comparação entre as inclinações</i>					
t_b	1,349	4,704	1,193	1,466	0,655
p	0,189	<<0,05	0,245	0,154	0,519

t_a = estatística t para contrastes entre interseções, t_b = estatística t para contrastes entre inclinações, p = significância. PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; FEM – feniletilamina. Valores em negrito e sublinhados são significativos a 5% de probabilidade.

4.2.3 Precisão e exatidão

O teste de Grubbs não indicou mais do que dois valores dispersos (22,2% dos nove dados originais), a 5% de significância, entre os resultados de recuperação aparente obtidos para amostras adicionadas das dez aminas em todos os níveis de concentração estudados. Os resíduos obtidos pela diferença entre a recuperação aparente média e os valores individuais de recuperação aparente em cada dia, para cada nível de concentração, apresentaram distribuição normal ($p > 0,10$) e homocedasticidade ($p > 0,05$), permitindo a estimativa do desvio padrão relativo de repetitividade (DPR_r) e do desvio padrão relativo de reprodutibilidade (DPR_R) por análise de variância.

As médias de recuperação aparente alcançadas para amostras de molho de soja adicionadas de 2,0 a 10,0 mg/L variaram entre 86,8 e 108,2%, estando na faixa aceitável (80,0 a 110,0%). Os valores de DPR_r variaram entre 0,65 e 6,4% e os valores de DPR_R obtidos variaram de 0,97 e 9,20% (Tabela 18). Valores de DPR_R e de DPR_r idênticos foram estimados quando a variância de repetitividade foi maior que a de reprodutibilidade, sendo atribuído o valor zero para variação entre ensaios (SOUZA, 2007).

Estes resultados sinalizaram a faixa de aplicabilidade do método validado na faixa de 2,0 a 10,0 mg/L para as aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina.

Tabela 18. Médias de recuperação aparente e desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de molho de soja adicionadas de putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em diferentes níveis de concentração

Concentração (mg/L)	\bar{R} (%)	DPR _r (%)	DPR _R (%)
Putrescina			
2,0	106,1	2,6	6,6
4,0	108,2	2,8	4,2
6,0	104,5	1,1	5,1
8,0	101,3	1,0	3,1
10,0	103,1	3,0	7,4
Cadaverina			
2,0	93,0	2,2	5,25
4,0	97,1	2,7	2,70
6,0	94,7	1,7	1,99
8,0	93,4	2,7	3,56
10,0	92,0	6,4	8,96
Histamina			
2,0	93,8	2,6	8,41
4,0	92,1	2,0	7,98
6,0	91,7	1,1	8,59
8,0	89,1	1,1	7,21
10,0	88,8	1,4	8,45
Tiramina			
2,0	89,9	2,4	2,87
4,0	88,7	2,1	2,08
6,0	88,6	1,2	4,48
8,0	86,8	0,7	7,19
10,0	89,0	1,7	9,20
Feniletilamina			
2,0	93,7	3,3	5,24
4,0	96,7	1,70	2,07
6,0	97,7	0,9	0,97
8,0	95,4	1,5	1,98
10,0	97,6	1,2	1,15

\bar{R} (%)= média de recuperação aparente, DPR_r = desvio padrão relativo de repetitividade, DPR_R = desvio padrão relativo de reprodutibilidade parcial.

Critérios de aceitação de para \bar{R} : 80% a 110%.

Critérios de aceitação para DPR_r: 2,0 mg/L: 9,6%; 4,0 mg/L: 8,7%; 6,0 mg/L: 8,1%; 8,00 mg/L: 7,8% e 10,0 mg/L: 7,5%.

Critérios de aceitação para DPR_R: 2,0 mg/L: 14,4%; 4,0 mg/L: 13,0%; 6,0 mg/L: 12,2%; 8,00 mg/L: 11,7% e 10,0 mg/L: 11,3%.

4.2.4 Limites de quantificação e detecção

Os limites de detecção calculados para cada amina estão mostrados na Tabela 19. Esses valores se referem à leitura da concentração da solução padrão de aminas na concentração de 0,2 mg/L, acrescida de três vezes o desvio padrão. Os limites de detecção variaram de 0,13 a 0,20 mg/L.

O limite de quantificação experimental do método foi de 2,0 mg/L para as cinco aminas (Tabela 19). O limite de quantificação para as aminas correspondeu ao menor nível de concentração estudado no qual os experimentos indicaram exatidão e precisão do método.

Tabela 19. Limites de detecção e de quantificação para as aminas estudadas na matriz molho de soja

Aminas	Limite de detecção (mg/L)	Limite de quantificação (mg/L)
Putrescina	0,18	2,0
Cadaverina	0,13	2,0
Histamina	0,19	2,0
Tiramina	0,16	2,0
Feniletilamina	0,20	2,0

4.3. AMINAS BIOATIVAS EM MOLHOS DE SOJA COLETADOS NO MERCADO DE BELO HORIZONTE/MG

4.3.1. Perfil de aminas bioativas nas amostras analisadas

Avaliou-se a presença das aminas PUT, CAD, HIM, TIM e FEM nas amostras de molho de soja, tendo sido encontradas as aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina nos percentuais mostrados na Figura 14.

A putrescina foi encontrada em 97,6% das amostras. STUTE et al. (2002) encontraram em 22% e YONGMEI et al. (2009) não encontraram putrescina em molhos de soja chineses e de outros países asiáticos.

A cadaverina foi encontrada em 28,6%, percentual menor do que o encontrado por YONGMEI et al. (2009) – 82,5%, porém, maior do que o valor encontrado por STUTE et al. (2002) – 13%. A feniletilamina foi encontrada em 57,1% das amostras analisadas. A tiramina foi encontrada em 100% das amostras analisadas. Este resultado está de acordo com os dados de STUTE et. al (2002), que concluíram que a tiramina era a amina biogênica predominante em molhos de soja, e que é formada no início da fermentação, principalmente pela bactéria *Enterococcus faecum*. YONGMEI et al. (2009) detectaram tiramina em 97,5% das amostras analisadas, valor próximo ao encontrado neste estudo. A histamina foi detectada em 78,6% das amostras, sendo que YONGMEI et al. (2009) encontraram histamina em 92,5% e STUTE et al. (2002) em 100% das amostras analisadas.

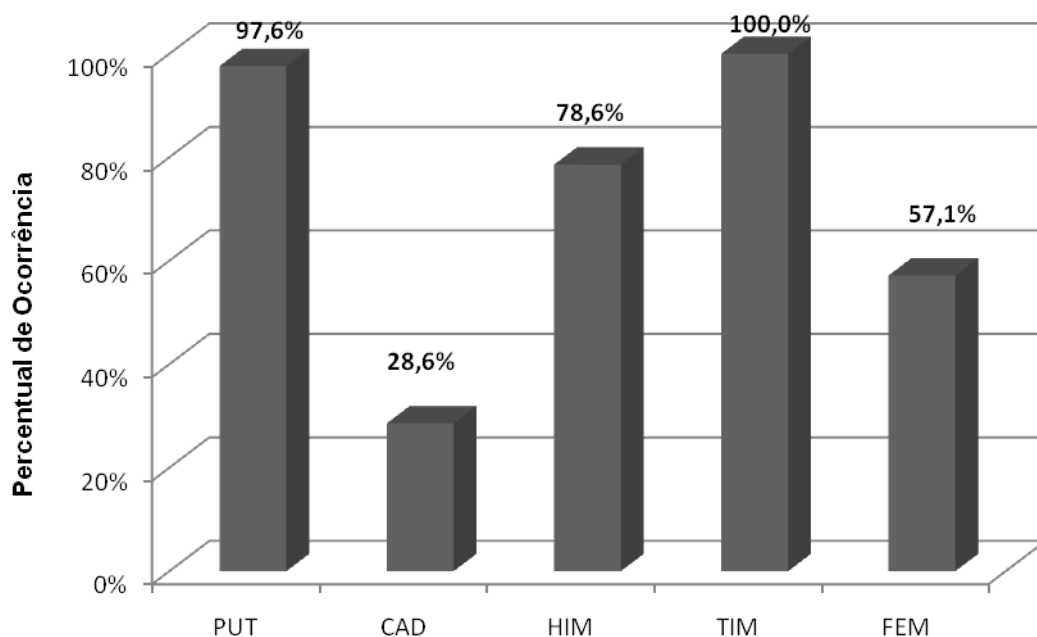


Figura 14. Percentual de ocorrência das aminas PUT, CAD, HIM, TIM e FEM em amostras de molho de soja (PUT: putrescina; CAD: cadaverina; HIM: histamina; TIM: tiramina; FEM: feniletilamina).

4.3.2. Teores de aminas bioativas nas amostras analisadas

A Tabela 20 apresenta os teores das aminas encontradas nas amostras analisadas. Os teores de putrescina variaram de <2,0 a 180 mg/L. As amostras da marca G apresentaram o maior teor de putrescina (180 mg/L). YONGMEI et al. (2009) não detectaram putrescina em amostras de molhos de soja chineses. BAEK et al. (1998) encontraram teores de putrescina em molhos de soja importadas da China, Japão e Taiwan variando entre 2,3 e 41,20 mg/L e KIRSCHBAUM et al. (2000) encontraram teores de 15,8 a 52,3 mg/L, valores menores do que o encontrado. Não há na literatura limites para a putrescina, entretanto, esta pode potencializar os efeitos adversos a saúde da histamina e da tiramina, que estão normalmente presentes em produtos fermentados, e que podem causar efeitos adversos à saúde, como enxaqueca, rubor facial, aumento da pressão sanguínea, febre, entre outros. Além disso, a putrescina e a cadaverina podem contribuir com um *flavor* pútrido ao molho, o que não é desejável no produto final.

A cadaverina foi encontrada em valores entre nd e 68,6 mg/L, valores menores do que aqueles encontrados por YONGMEI et al. (2009), que foi de nd a 550 mg/L em molhos de soja chineses. A marca C foi a que apresentou os maiores teores de cadaverina. BAEK et al. (1998) e KIRSCHBAUM et al. (2000) não detectaram cadaverina nos molhos de soja estudados.

Tabela 20. Teores de aminas em molhos de soja adquiridos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG no período de julho de 2009 a fevereiro de 2010

		Concentração de aminas (mg/L)				
Marca		PUT	CAD	HIM	TIM	FEM
A	faixa	<2,0 - 8,24	<2,0 - 16,23	nd - 1,01	3,00 - 8,06	nd
	média	3,77	5,46	1,01	5,12	-
	DP	3,15	7,24	0,00	2,20	-
B	faixa	13,26 - 96,72	nd	94,24 - 196,39	101,75 - 298,21	19,44 - 99,35
	média	57,71	-	155,50	188,50	58,50
	DP	35,06	-	45,98	80,78	31,16
C	faixa	<2,0 - 19,59	<2,0 - 68,57	nd - 1,20	3,30 - 21,75	nd
	média	7,37	20,07	1,26	8,55	-
	DP	6,91	24,60	0,08	7,30	-
D	faixa	2,39 - 38,45	nd	21,79 - 99,44	37,72 - 155,68	6,73 - 41,43
	média	16,60	-	78,19	116,34	23,04
	DP	15,31	-	28,29	48,89	12,96
E	faixa	7,85 - 28,17	nd	102,32 - 395,04	110,74 - 659,94	11,10 - 121,92
	média	14,42	-	306,98	402,47	52,07
	DP	8,00	-	108,43	198,69	47,07
F	faixa	4,08 - 58,06	nd	81,05 - 315,21	62,97 - 313,02	8,87 - 90,88
	média	24,64	-	184,41	224,99	42,90
	DP	21,39	-	79,23	88,46	36,75
G	faixa	<2,0 - 179,98	nd	63,40 - 201,70	52,30 - 232,08	6,66 - 82,01
	média	33,74	-	135,10	164,77	34,33
	DP	71,69	-	53,13	71,35	30,40

PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; FEM – feniletilamina.

DP – desvio padrão.

nd – não detectado.

Com relação a histamina, os teores variaram de nd a 395 mg/L, sendo que a marca E foi a que apresentou os maiores teores. Este valor é menor do que a faixa encontrada por YONGMEI et al. (2009) em molhos de soja chineses – nd a 592 mg/L e do que os valores encontrados por BAEK et al. (1998) - 5,6 a 418,9 mg/L e maior do que a faixa encontrada por KIRSCHBAUM et al. (2000) – 34,9 a 157 mg/L. A marca F também apresentou valores elevados de histamina, possivelmente devido a sua fabricação ser através de fermentação natural, o que possibilita maior ação dos microrganismos contaminantes (*Bacillus*, por exemplo) que poderiam formar as aminas. HALÁSZ et al. (1994) sugeriram um limite máximo de 10 mg de histamina em 100 g de alimentos. Das 42 amostras analisadas, 20 (48%) apresentaram teores de histamina maiores do que este limite, sendo as mesmas das marcas B, E, F e G.

A tiramina foi a amina encontrada em maiores teores nos molhos de soja estudados, variando entre 3,0 e 660 mg/L, valores próximos aos encontrados por BAEK et al. (1998) – 1,8 a 646,9 mg/L – e por YONGMEI et al. (2009) – nd a 673 mg/L – e superiores àqueles encontrados por KIRSCHBAUM et al. (2000) – 17,7 a 172 mg/L. A

marca E foi a que apresentou maiores teores de tiramina. A tiramina pode ser formada durante o processamento, principalmente na fermentação e em etapas subsequentes. Essa formação está associada principalmente à falta de higiene, que pode levar ao desenvolvimento de microrganismos formadores de aminas, e às enzimas produzidas pelas culturas naturalmente presentes na fermentação do *shoyu* (ROMERO et al., 2003; GLÓRIA, 2005). Segundo KALAC e KRIZEK (2003), para pacientes que utilizam IMAO, um consumo de 6 mg de tiramina num período de 4 h, seria considerado perigoso para estes pacientes. Considerando a marca que apresentou o maior teor de tiramina (660 mg/L), seria necessário aproximadamente 10 mL de molho de soja para se atingir esta ingestão. Quando consomem alimentos ricos em tiramina, cerca de 30% dos indivíduos com enxaqueca clássica, podem ter dor de cabeça (COUTTS, 1986). HALÁSZ et al. (1994) sugeriram um limite máximo de 10 mg de tiramina em 100 g de alimentos. Das 42 amostras analisadas, 27 (64%) apresentaram teores de tiramina maiores do que este limite e 28 (67%) apresentaram teores maiores do que 6 mg/100 g.

A feniletilamina foi encontrada em valores entre nd e 121,9 mg/L, sendo a marca E a que apresentou o maior teor. STUTE et al. (2002) e YONGMEI et al. (2009) não encontraram feniletilamina em suas amostras. KIRSCHBAUM et al. (2000) encontraram valores de feniletilamina entre nd e 68,5 mg/L e BAEK et al. (1998) entre 12,5 e 55,9 mg/L. O limite máximo sugerido por HALÁSZ et al. (1994) é de 3 mg de feniletilamina em 100 g de alimentos. Das 42 amostras analisadas, 13 (31%) apresentaram teores de feniletilamina maiores do que este limite.

Algumas marcas de molho de soja apresentaram lotes com teores de aminas acima do limite máximo sugerido, como mostra a Figura 15. As marcas que apresentaram maior número de lotes nesta situação foram as marcas B, D, E, F e G, podendo ser um indicativo de falta de controle durante a produção desses molhos, principalmente durante a etapa de fermentação e/ou a má qualidade das matérias-primas utilizadas. Nota-se que as marcas comerciais de molho de soja do mercado de Belo Horizonte, MG apresentaram teores elevados de aminas biogênicas, podendo levar à intoxicação dos consumidores, dependendo da quantidade ingerida e da sensibilidade do indivíduo.

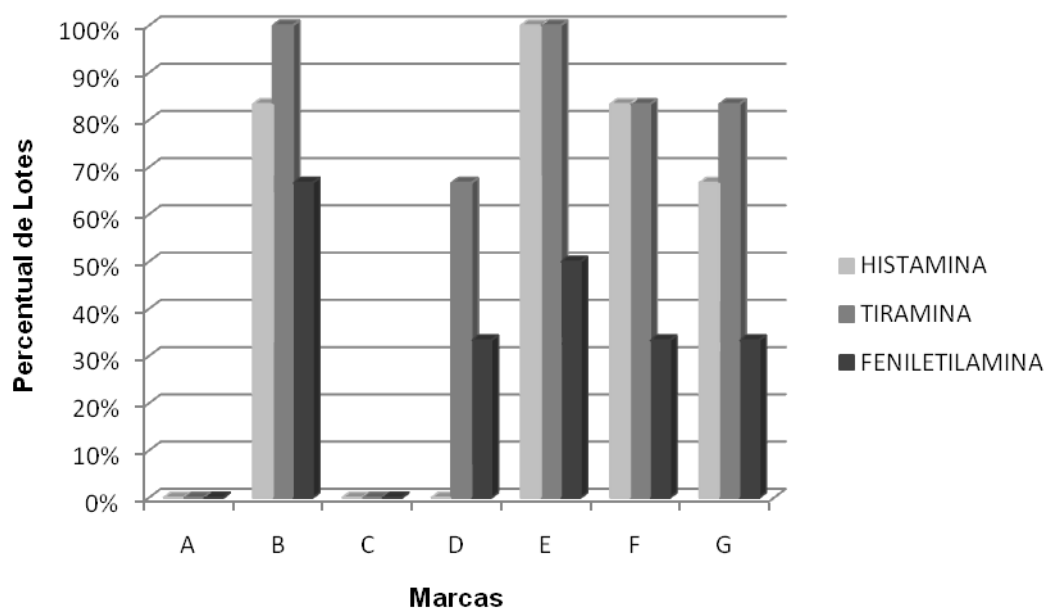


Figura 15. Percentual de lotes, para cada marca, com teores de histamina, tiramina e feniletilamina acima dos valores considerados capazes de causar efeitos adversos à saúde.

Podemos perceber que a marca E foi a que apresentou maiores teores de histamina, tiramina e feniletilamina. Isto pode ter ocorrido, possivelmente, devido ao teor reduzido de sal desta amostra, que possui 32% menos sódio que os molhos de soja tradicionais, o que pode ter prejudicado a conservação do mesmo, propiciando o crescimento de bactérias capazes de formar estas aminas.

Além disso, as marcas A e C foram as que apresentaram menores teores das aminas estudadas. Essas duas marcas não apresentam em seus rótulos a informação de que são produzidas por fermentação natural, o que nos leva a sugerir que as mesmas foram fabricadas por hidrólise ácida em substituição ou em conjunto com a fermentação, para reduzir o tempo de fabricação e o custo do produto. Já as marcas B, D, E, F e G indicam em seus rótulos que foram fabricadas por fermentação natural e apresentaram maiores teores de aminas. Este pode ter sido o motivo do menor teor de aminas nas primeiras, pois o processo de fermentação natural, quando não é bem controlado, propicia maior probabilidade de desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, devido ao tempo mais longo de produção.

4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS MOLHOS DE SOJA COLETADOS NO MERCADO DE BELO HORIZONTE/MG

4.4.1. Determinação de pH, acidez e sólidos solúveis (°Brix)

Algumas características físico-químicas dos molhos de soja coletados no mercado de Belo Horizonte/MG foram avaliadas. Os resultados encontram-se dispostos na Tabela 21.

O pH variou de 4,0 a 5,3, coincidindo com a faixa de pH encontrada por YONGMEI et al. (2009) que foi de 4,0 a 4,8. A acidez variou entre 290,6 e 1312,9 meq/L para os grupos analisados e o teor de sólidos solúveis variou de 22 a 30 °Brix.

Como não existe legislação que defina os padrões de identidade e qualidade de molhos de soja, não foi possível comparação com a mesma.

Tabela 21. Características físico-químicas das amostras de molhos de soja adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG no período de julho de 2009 a fevereiro de 2010

Marca	Características físico-químicas			
		pH	acidez (meq/L)	°Brix
A	faixa	4,47 - 4,65	371,11 - 462,13	22 - 28,5
	média	4,53	410,20	25,42
	DP	0,07	30,23	2,06
B	faixa	4,00 - 4,37	1109,82 - 1312,88	33 - 34,5
	média	4,28	1184,51	34,00
	DP	0,14	94,30	0,77
C	faixa	4,24 - 5,27	301,09 - 616,18	25 - 30
	média	4,75	407,28	27,67
	DP	0,34	114,64	1,72
D	faixa	4,93 - 5,06	290,58 - 346,60	28,5 - 37
	média	4,95	316,84	34,92
	DP	0,06	24,13	3,17
E	faixa	4,45 - 4,60	934,77 - 1092,31	27,00
	média	4,52	1013,54	27,00
	DP	0,07	64,58	0,00
F	faixa	4,77 - 4,82	406,12 - 521,64	37,5 - 39
	média	4,79	486,06	38,75
	DP	0,02	42,21	0,61
G	faixa	4,82 - 4,96	437,98 - 525,15	37,5 - 39
	média	4,92	500,12	37,75
	DP	0,05	31,29	0,61

DP – desvio padrão.

4.4.2. Relação entre o teor de aminos bioativas em molho de soja com os diferentes tipos de fermentação e com as características físico-químicas

Como mostrado na Tabela 22, a acidez correlacionou-se positivamente com todas as aminos, exceto com a cadaverina. Tal correlação era esperada, pois a acidez é um fator fundamental na formação de aminos. Segundo SILLA SANTOS (1996), o pH ótimo de ação das enzimas aminoácido descarboxilase é na faixa de 4,0 – 5,5, coincidindo com o pH das amostras.

Tabela 22. Correlação entre os teores de aminos e as características físico-químicas das amostras

Parâmetros	Aminos					
	PUT	CAD	HIM	TIM	FEM	Total
pH	0,467	0,077	0,215	0,342	0,263	0,235
acidez	<u>0,048</u>	0,106	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,001</u>	<u>0,000</u>
sólidos solúveis	0,082	<u>0,040</u>	0,198	0,346	0,080	0,164

p-valor obtido pela correlação de Pearson, 95% de confiança.

Valores em negrito e sublinhados são significativos a 5% de probabilidade.

PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; FEM – feniletilamina; total - soma das cinco aminos.

Calculou-se a correlação entre as aminos analisadas, visando identificar as que são influenciadas pelos mesmos fatores. Os resultados se encontram na Tabela 23.

Tabela 23. Correlação entre os teores de aminos das amostras analisadas

Parâmetros	Aminos					
	PUT	CAD	HIM	TIM	FEM	TOTAL
PUT		0,556	0,684	0,719	<u>0,000</u>	0,112
CAD			<u>0,024</u>	<u>0,048</u>	0,064	<u>0,040</u>
HIM				<u>0,000</u>	<u>0,042</u>	<u>0,000</u>
TIM					<u>0,046</u>	<u>0,000</u>
FEM						<u>0,001</u>

p-valor obtido pela correlação de Pearson, 95% de confiança

Valores em negrito e sublinhados são significativos a 5% de probabilidade

PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; FEM – feniletilamina; TOTAL-soma das cinco aminos.

A putrescina teve correlação positiva com a feniletilamina. Existe correlação entre as aminos cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina. Isto se deve, possivelmente, pelo fato destas aminos serem formadas a partir de aminoácidos livres presentes nas matérias-primas e que são transformados em aminos através de bactérias durante a etapa de fermentação na produção do molho de soja.

5 CONCLUSÕES

As condições ótimas para a extração de aminos bioativas em molho de soja foram definidas como: 6 mL de molho de soja, 15 mL de TCA 5%, 4 minutos de agitação e sem centrifugação.

O método para a determinação de aminos bioativas por CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com OPA e detecção fluorimétrica foi validado para análise das aminos putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e feniletilamina em molho de soja. O método apresentou uma faixa linear para todas as aminos (2 a 10 mg/L). Observou-se efeito de matriz. Precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação encontrados foram adequados para análise de aminos em molho de soja.

As aminos estudadas foram encontradas nos molhos de soja nos seguintes teores: putrescina (nd a 180 mg/L), cadaverina (nd e 68,6 mg/L), histamina (nd a 395 mg/L), tiramina (nd e 660 mg/L) e feniletilamina (nd e 121,9 mg/L). Algumas amostras apresentaram teores das aminos histamina, tiramina e feniletilamina maiores do que os teores capazes de causar efeito adverso a saúde (HIM - 48%; TIM - 64%; e FEM - 31%), indicando a possibilidade de causar intoxicação ao consumidor, dependendo da quantidade ingerida e da sensibilidade de cada indivíduo. O alto teor de aminos biogênicas sugere também a falta de controle da indústria durante a produção desses molhos, principalmente durante a etapa de fermentação e/ou a má qualidade das matérias-primas utilizadas.

A acidez correlacionou-se positivamente com todas as aminos, exceto com a cadaverina, sugerindo ser um fator importante na formação de aminos em molho de soja.

Conclui-se, portanto, que há a necessidade de se estabelecer padrões de identidade e qualidade para os molhos de soja produzidos no Brasil e que as aminos bioativas poderiam ser usadas como critério de qualidade nesse produto, já que estão presentes em teores altos e, por serem termo-resistentes, permanecem no produto final, mesmo após a pasteurização.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). NBR ISO/IEC 8402:1994. Gestão da qualidade e garantia da qualidade. Terminologia. Rio de Janeiro. 15 p. 1994.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). NBR ISO/IEC 17025:2005. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 31 p., 2005.
- ANCÍN-AZPILICUETA, C.; GONZÁLES-MARCO, A.; JIMÉNEZ-MORENO, N. Current knowledge about the presence of amines in wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 257-275, 2008.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. Biotecnologia Industrial, Biotecnologia na Produção de Alimentos, São Paulo, v. 4, p. 476-485, 2001.
- BAEK, I.; WEITKAMP, C.; ERBE, T.; MEIER, A.; KIRSCHBAUM, J.; BRÜCKNER, H. Determination of amino acids and biogenic amines in oriental fermented food and beverages for quality assessment. **3rd Karlsruhe Nutrition Symposium European Research towards Safer and Better Food**, p. 98-102, 1998.
- BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; RALPH, A.; PUSZTAI, A. Polyamines in food: implications for growth and health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, p. 66-71, 1993.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends of Food Science and Technology**, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BARET, V.; LEWIS, T. Outliers in statistical data. 3ed. New York: John Wiley, 1994. 604 p.
- BAUZA, T.; BLAISE, A.; TEISSEDE, P.L.; CABANIS, J.C. Les amines biogènes du vin, métabolisme et toxicité. **Bulletin L'O.I.V.**, v. 68, p. 42-67, 1995.
- BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v. 140, p. 103-125, 1999.
- BRINK, B.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H.M.; VELD, H. I.; J.H.J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p. 73-84, 1990.
- BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for equality of variances. **Journal of the American Statistical Association** v. 69, p. 364-367, 1974.
- BURKE, S. Missing values, outliers, robust statistics and non-parametric methods. **LC GC**, v. 59, p. 19-24, 2001.

- BUSTO, O.; VALERO, Y.; GUASCH, J.; BORRUL, F. Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC. **Chromatographia**, v. 38, n. 9/10, p. 571-578, 1994.
- CHANG, S.F.; AYRES, J.W.; SANDINE, W.S. Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine, and tryptophan. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2840-2846, 1985.
- CINQUINA, A.L.; CALI, A.; LONGO, F.; DE SANTIS, L.; SEVERONI, A.; ABBALE, F. Determination of biogenic amines in fish tissues by ion-exchange chromatography with conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 73-77, 2004a.
- CONCA, R.; BRUZZONITI, M.C.; MENTASTI, E.; SARZANINI, C.; HAJOS, P. Ion chromatographic separation of polyamines: putrescine, spermidine and spermine. **Analytical Chimica Acta**, v. 439, p. 107-114, 2001.
- COUTTS, R.T.; BAKER, G.B.; PASUTTO, F.M. Foodstuffs as sources of psychoactive amines and their precursors: content, significance and identification. **Advances in Drug Research**, v. 15, p. 169-232, 1986.
- CUSTÓDIO, F.B. Eficiência e seletividade da extração, purificação e detecção de histamina e tiramina em queijo ralado. Belo Horizonte: UFMG. 2006. 153 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- DALGAARD, P.; MADSEN, H.L.; SAMIEIAN, N.; EMBORG, J. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish - effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 80-95, 2006.
- DONHAUSER, S.; WAGNER, D.; GEIGER, E. Biogenic amines: significance, occurrence and assessment. **Brewelt International**, v. 11, p. 100-107, 1993.
- DROLET, G., DUMBROFF, E.B.; LEGGE, R.L.; THOMPSON, J.E. Radical scavenging properties of polyamines. **Phytochemistry**, v. 25, p. 367-371, 1986.
- DUFLOS, G.; DERVIN, C.; MALLE, P.; BOUQUELET, S. Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in Plaice (*Pleuronectes platessa*) and Whiting (*Merlangus merlangus*). **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 82, n. 5, p. 1097-1101, 1999.
- DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least square regression. **Biometrika**, v. 38, p. 159-178, 1951.
- EC (European Commission), Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, 2002, L 221/8.

- ELIASSEN, K.A.; REISTAD, R.; RISOEN, U.; RONNING, H.F. Dietary polyamines. **Food Chemistry**, v. 78, p. 273-280, 2002.
- EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. 61 p., 1998.
- FLORES, H.E.; PROTACIO, C.M.; SIGNS, M.W. Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. **Phytochemistry** v. 23, p. 329-393, 1989.
- FOY, M.J.; PARRAT, J.R. A note on the presence of noradrenaline and 5-hidroxytryptamine in Plantain (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*). **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, v. 13, p. 361-364, 1961.
- FUZIKAWA, C.S.; HARA, C.; GLÓRIA, M.B.A.; ROCHA, F.L. Monoaminoxidase inhibitors and diet – Update and practical recommendations for clinical use. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 48, p. 453-460, 1999.
- GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines. In H. Hui; L.L. Nollet. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. Ed. Marcel Dekker, v. 4, p. 1-38, 2005.
- GLÓRIA, M.B.A.; DAESCHEL, M.A. Metodologia para a determinação de aminas 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.; TAVARES-NETO, J.; LABANCA, R.A. Influence of cultivar and germination on bioactive amines in soybeans (*Glycine max* L. Merrill). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 19, p. 7480-7485, 2005.
- GLÓRIA, M.B.A.; VIEIRA, S.M. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. **Food**, v.1, p. 258-270, 2007.
- GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1647 p.
- GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics** v. 11, p. 1-21, 1969.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, p. 42-49, 1994.
- HESSELTINE, C.W. Solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 12, n. 24-27, p. 29-32, 1977.
- HILLARY, A.R.; PEGG, A.E. Decarboxylases involved in polyamines biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. **Biochemical Biophysics Acta**, v. 1647, p. 161-166, 2003.

- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54, p. 67A-76A, 1982.
- HORWITZ, W. Protocol for design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, p. 331-343, 1995.
- HUI, J.Y.; TAYLOR, S.L. Decomposition in food. **Journal of the Association of Official and Analytical Chemists**, Arlington, v. 66, p. 853-857, 1983.
- IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4. ed. Brasília: Editora ANVISA, 2005. 1018 p.
- IBE, A.; SAITO, K.; NAKAZATO, M.; KIKUCHI, Y.; FUJINUMA, K.; NISHIMA, T. Quantitative determination of amines in wine by liquid chromatography. **Journal of the Association of Official and Analytical Chemists**, v. 74, n. 4, p. 695-698, 1991.
- ICH. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Validation of analytical procedures**. Geneve, 1996.
- INGLES, D.L.; BACK, J.F.; GALLIMORE, D.; TINDALE, R.; SHAW, K.J. Estimation of biogenic amines in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 402-406, 1985.
- INGLES, D.L.; TINDALE, R.; GALLIMORE, D. Adsorption of biogenic amines by food constituents and some related substances. **Chemical Industry**, n. 10, p. 415-416, 1980.
- INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2007. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 02 Junho/2007, 25p.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; HERNÁNDEZ-JOVER, T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines in European beers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3159-3163, 1996.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; VIDAL-CAROU, M.C.; MARINÉ-FONT, A. Determination of biogenic amines in beers and their raw materials by ion-pair liquid chromatography with post-column derivatization. **Journal of the Association of Official and Analytical Chemists International**, v. 76, p. 1027-1032, 1993.
- JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I General concepts and guidelines. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 19, p. 719-736, 1996.

- KALAC, P.; GLÓRIA, M.B.A. Biogenic amines in cheeses, wines, beers and sauerkraut. In D. Dandriofosse (ed). **Biological aspects of biogenic amines, polyamines and conjugates**, 2009, p. 267-309.
- KALAČ, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chemistry**, v. 90, p. 219-230, 2005.
- KALAC, P.; KRIZEK, M. A review of biogenic amines and polyamines in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 109, n. 2, p. 123-128, 2003.
- KALAČ, P.; ŠVECOVÁ, S.; PELIKÁNOVÁ, T. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. **Food Chemistry**, v. 77, p. 349-351, 2002.
- KHUHAWAR, M.Y.; QURESHI, G.A. Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. **Journal of Chromatography B**, v. 764, p. 385-407, 2001.
- KIRSCHBAUM, J.; LUCKAS, B.; BEINERT, W.D. HPLC analysis of biogenic amines and amino acids in food after automatic pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. **American Laboratory**, p. 28C-28H, 1994.
- KIRSCHBAUM, J.; REBSCHER, K.; BRUCKNER, H. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fermented foods after derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 517-530, 2000.
- KOEHLER, P.E.; EITENMILLER, R.R. High pressure liquid chromatographic analysis of tyramine, phenylethylamine and tryptamine in sausage, cheese and chocolate. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 1245-1247, 1978.
- LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Editora Rima, 2004. 62p.
- LANDETE, J.M.; FERRER, S.; PARDO, I. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. **Food Control**, v. 18, p. 169-174, 2007.
- LANGE, J.; THOMAS, K.; WITTMAN, C. Comparison of a capillary eletrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. **Journal of Chromatography B.**, v. 779, p. 229-239, 2002.
- LAPA-GUIMARÃES, J. **Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e uréia como índices químicos de qualidade e frescor de pescado**. Campinas: UNICAMP. 2005. 125 p. (Tese, Doutorado em Tecnologia de Alimentos).
- LARQUÉ, E.; SABATER-MOLINA, M.; ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. **Nutrition**, v. 23, p. 87-95, 2007.
- LAVIZZARI, T.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; BOVER-CID, S.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Improved method for the determination of biogenic amines and

- polyamines in vegetable products by ion-pair high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1129, p. 67-72, 2006.
- LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, p. 1-37, 2000.
- LEITING, V.A.; WICKER, L. Inorganic cations and polyamines moderate pectinesterase activity. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 253-255, 1997.
- LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S.G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.) Contributions to probability and statistics. Stanford: Stanford University Press, 1960. p. 278-292.
- LIMA, A.S. Metodologia para a determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência-par iônico. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 1999. 77 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, p. 70-79, 1999.
- LÖSER, C. Polyamines in human and animal milk. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. S55-S58, 2000.
- LUH, B.S. Industrial production of soy sauce. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 467-471, 1995.
- MAGA, J.A. Amines in foods. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, v. 10, p. 373-403, 1978.
- MAIJALA, R.; EEROLA, S.H.; AHO, M.A.; HIRN, J.A. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amine in meat. **Journal of Food Protection**, v. 56, p.125-129, 1993.
- MALLE, P.; VALLE, M.; BOUQUELET, S. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. **Journal of the Association of Official and Analytical Chemists International**, v. 79, n. 1, p. 43-49, 1996.
- MANFROI, L.; SILVA, P.H.A.; RIZZON, L.A.; SABAINI, P.S.; GLÓRIA, M.B.A. Influence of alcoholic and malolactic starter cultures on bioactive amines in Merlot wines. **Food Chemistry**, v. 116, p. 208-213, 2009.
- MARINO, M.; MAIFRENI, M.; MORET, S.; RONDININI, G. The capacity of enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. **Letters of Applied Microbiology**, v. 31, p. 169-173, 2000.
- MIETZ, L.J.; KARMAS, E. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition. **Journal of the Association of Official and Analytical Chemists**, v. 61, n. 1, p. 139-145, 1978.

- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 184-197, 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. **Journal of Chromatography A**, v. 729, p. 363-369, 1996.
- NAGATSU, T. Application of high-performance liquid chromatography to study of biogenic amine-related enzymes. **Journal of Chromatography**, v. 566, n. 2, p. 287-307, 1991.
- OHTA, H.; YOZA, K.I.; TAKEDA, Y.; NOGATA, Y. Influence of storage temperature on the polyamine level and ethylene production in broccoli (*Brassica oleraceae*, Italica group). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 5, p. 831-831, 1993.
- ÖNAL, A. A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1475-1486, 2007.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14 ed., Piracicaba, 477 p. 2000.
- REUVERS, T.B.A.; MARTIN DEPOZUELO, M.; RAMOS, M.O.; JIMENEZ, R. A rapid ion-pair HPLC procedure for the determination of tyramine in dairy products. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 1, p. 84-86, 1986.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RICE, S.; EITENMILLER, R.R.; KOEHLER, P.E. Biologically active amines in food: a review. **Journal of Milk Food Technology**, v. 39, p. 353-358, 1976.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1ª ed., Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.
- ROMERO, R.; BAGUR, M.G.; SÁNCHEZ-VIÑAS, M.; GÁZQUEZ, D. Influence of the brewing process on the formation of biogenic amines in beers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p. 162-167, 2003.
- RONNING, H.T.; EINARSEN, K.; ASP, T.N. Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1118, p. 226-233, 2006.
- RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal probability plots and test for normality**. The State College: Pennsylvania State University, 1976. 15 p.

- SATO, H.; SAKAMURA, S.; OBATA, Y. The isolation and characterization of N-methyltyramine, tyramine and hordenine from sawa miller seeds. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 34, n. 8, p. 1254-1255, 1970.
- SBRT (Sistema Brasileiro de Respostas Técnicas). Disponível em <http://www.sbrt.ibict.br>. Acesso em 15/02/2010.
- SHALABY, A.R. Multidetecção, semiquantitativa method for determining biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 52, p. 367-372, 1995.
- SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, p. 675-690, 1996.
- SHIOZAKI, S.; OGATA, T.; HORIUCHI, S. Endogenous polyamines in the pericarp and seed of the grape berry during development and ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 83, p. 33-41, 2000.
- SILLA-SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 213-231, 1996.
- SILVA, T.M. Otimização e validação do método para determinação de histamina em pescado. Faculdade de Farmácia da UFMG. 2008. 179 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- SIMON-SARKADI, L. **Methods for detection and quantification of biogenic amines**. In: Biogenic amines in foods and beverages symposium. Oregon State University, Corvallis Oregon, EUA, 1994.
- SMITH, T.A. Amines in food. **Food Chemistry**, v. 6, p. 169-200, 1980-81.
- SMITH, T.A. Putrescine and inorganic ions. **Annals of Reviews and Plant Physiology**, v. 18, p. 6-54, 1984.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. Statistical methods. Ames: Iowa State University, 1989. 503 p.
- SOARES, V.F.M.; GLÓRIA, M.B.A. Histamine levels in canned fish available in the retail market of Belo Horizonte, MG, Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 7, p. 102-107, 1994.
- SOUZA, S.V.C.; BRITO, R.B. **Validação de métodos: aplicação em análises de resíduos em alimentos**. In: Encontro para a Qualidade de Laboratórios. Anais. São Paulo: REMESP. p. 155-163, 2002.
- SOUZA, S.V.C.; SILVA, G.; DINIZ, M.H.G.M. Determinação de resíduos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina e tecidos de origem animal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 34-38, 2001.

- SOUZA, S.V.C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 296 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- STEINKRANS, K.H. **Industrialization of Indigenous Fermented Foods**. Marcel Dekker, New York, 1989.
- STRATTON, J.E.; HUTKINS, R.W.; TAYLOR, S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 460-470, 1991.
- STUTE, R.; PETRIDIS, K.; STEINHART, H.; BIERNOTH, G. Biogenic amines in fish and soy sauces. **European Food Research and Technology**, v. 215, p. 101-107, 2002.
- TAYLOR, S.L. Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods. Genebra, **World Health Organization**, p. 1-45, 1985.
- TAYLOR, S.L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 17, p. 91-128, 1986.
- THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. **Analyst**, v. 125, n. 3, p. 385-386, 2000.
- UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina). Disponível em http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2004/shoyo/preparacao.htm. Acesso em 19/10/09.
- VALE, S.R.; GLÓRIA, M.B.A. Determination of biogenic amines in cheese. **Journal of the Association of Official and Analytical Chemists International**, Arlington, v. 80, p. 1006-1012, 1997.
- VANDERKERCKHOVE, P. Amines in dry fermented sausage. **Journal of Food Science**, v. 42, p. 83-285, 1977.
- VECIANA-NOGUÉS, M.C.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines and organoleptic changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2036-2041, 1997.
- VOIGHT, M.N.; EITENMILLER, R.R.; KOEHLER, P.E.; HAMDY, M.K. Tyramine, histamine and tryptamine content of cheese. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 37, n. 7, p. 377-381, 1974.
- WALTERS, D.R. Polyamines and plant disease. *Photochemistry*, v. 64, p. 97-107, 2003.
- WARTHESEN, J.; SCANLAN, R.; BILLS, D.; LIBBEY, L. Formation of heterocyclic N-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 898-902, 1975.

- WHITAKER, J.R. Biochemical changes occurring during the fermentation of high-protein foods. **Food Technology**, v. 32, n. 5, p. 175-180, 1978.
- WINDHOLZ, M. (Ed.) **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 10^a ed. Rahway: Merck, 1996. 2066 p.
- YOKOTSUKA, T. Soy sauce biochemistry. In: **Advances in Food Research**, v. 30 (Chichester, C.O., E.M. Mrak and B.S. Schweigert, eds), pp. 195-329, Academic Press, Orlando, FL, 1986.
- YONGMEI, L.; XIAOHONG, C.; MEI, J.; XIN, L.; RAHMAN, N.; MINGSHENG, G.; YAN, G. Biogenic amines in Chinese soy sauce. **Food Control**, v. 20, p. 593-597, 2009.
- ZEE, J.A.; SIMARD, R.E.; L'HEUREUX, L. Evaluation of analytical methods for determination of biogenic amines in fresh and processed meat. **Journal of Food Protection**, 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. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 18, p. 245-248, 1985.