



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos**

**MÁRCIA REGINA CUCATTI ALVES**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS**  
**EM MORTADELA UTILIZANDO UPLC-MS/MS**

**CAMPINAS**

**2017**



**MÁRCIA REGINA CUCATTI ALVES**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS  
EM MORTADELA UTILIZANDO UPLC-MS/MS**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Tecnologia de Alimentos para obtenção do  
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos.*

Aluna: Márcia Regina Cucatti Alves

Orientadora: Profa. Dra. Regina Prado  
Zanes Furlani

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Márcia Regina Cucatti Alves e orientada pela Profa. Dra. Regina Prado Zanes Furlani.

**CAMPINAS**

**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Bibliotecária Adriana Gomes do Nascimento CRB/8 8853  
Biblioteca Central do ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos.

A474v Alves, Márcia Regina Cucatti. Validação de método para determinação de aminas biogênicas em mortadela utilizando UPLC-MS/MS. Márcia Regina Cucatti Alves/ Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2018.

30f.

Prof(a). Regina Prado Zanes Furlani

1.Aminas biogênicas. 2. Mortadela. 3. UPLC-MS/MS. 4. Derivatização.  
I. Instituto de Tecnologia de Alimentos, CQQA – Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos II. Márcia Regina Cucatti Alves. III. Título.

**Título em Inglês:** Method validation for determination of biogenic amines in mortadella using UPLC-MS/MS

**Key-words:** biogenic amines; bologna; mortadella; UPLC-MS/MS; derivatization

**Titulação:** Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Banca Examinadora:**

Regina Prado Zanes Furlani [orientador]

José Ricardo Gonçalves

Vera Sonia Nunes da Silva

**Data da Defesa:** 20/12/2017

**Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

## BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Márcia Regina Cucatti Alves, aprovada pela Comissão Julgadora em 20/12/2017.



---

Profa. Dra. Regina Prado Zanes Furlani  
CCQA-ITAL(Orientadora)



---

Dr. José Ricardo Gonçalves  
CTC-ITAL



---

Dra. Vera Sonia Nunes da Silva  
CCQA-ITAL



## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho aos meus pais Luiza e Antonio, que sempre priorizaram e incentivaram meus estudos.

Aos meus filhos João Pedro e Felipe, para quem quero ser um bom exemplo e ao meu esposo Marcio, pela ajuda e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter permitido que eu realizasse esse trabalho.

À Ana Lúcia da Silva Corrêa Lemos, diretora do Centro de Tecnologia de Carnes, pela oportunidade que me concedeu para cursar o Mestrado e pelo apoio constante.

Ao Eduardo Orlando e à Mary Ângela Perez pelos conhecimentos compartilhados e por estarem sempre disponíveis para ajudar.

À Fabiana Niglio pelo “empurrãozinho” que faltava para que eu me inscrevesse no processo seletivo para o Mestrado.

À Suzana Yotsuyanagi pelo incentivo e colaboração.

À Jéssica Castro pela grande ajuda no laboratório e à Miriam Marquezini pelas discussões “microbiológicas”.

À minha orientadora Regina, pela paciência, compreensão e pelos conhecimentos que me proporcionou.

Aos Colegas do CTC, que colaboraram direta ou indiretamente para que eu pudesse me dedicar a esse trabalho, em especial ao José Ricardo Gonçalves, que assumiu prontamente parte das minhas funções no CTC.

Muito obrigada!



## RESUMO

As aminas biogênicas são compostos produzidos a partir da ação de alguns micro-organismos sobre aminoácidos e que podem ser contaminantes de alguns alimentos. Sua formação pode ocorrer durante a vida útil ou o armazenamento de alimentos e causar danos à saúde humana quando ingeridas. Esses compostos podem ser indicadores químicos das condições de higiene de alimentos *in natura* e/ou das práticas de processamento, uma vez que sua formação está associada com a atividade de micro-organismos contaminantes. As carnes e os produtos cárneos são alimentos em que algumas aminas biogênicas ocorrem com frequência. Os métodos analíticos mais utilizados para determinação de aminas biogênicas empregam derivatização das moléculas para que possam ser quantificadas por técnicas de HPLC com detectores de ultravioleta ou fluorescência. Esse trabalho propôs estabelecer um método analítico para identificar e quantificar as aminas biogênicas putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina sem necessidade de derivatização dessas moléculas. A técnica utilizada foi cromatografia líquida de ultra eficiência seguida de detecção por espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS), amplamente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, uma vez que possibilita um aumento na sensibilidade e reduz a interferência de compostos presentes na matriz. Foi utilizada fase estacionária C18 e fases móveis água e acetonitrila adicionadas de ácido pentafluorpropiónico (PFPA), em equipamento com ionização por eletrospray e analisador triploquadrupolo. Foram obtidas recuperações entre 96,7 e 109,9%; limites de quantificação de 0,2 mg kg<sup>-1</sup> para putrescina, cadaverina e histamina, 0,25 mg kg<sup>-1</sup> para espermidina e 2,5 mg kg<sup>-1</sup> para espermina, e coeficientes de variação entre 0,4 e 5,6%. Os resultados obtidos na validação demonstraram que o método desenvolvido é adequado para análise de mortadelas. Esse método foi aplicado para análise de mortadelas comercializadas em Campinas – SP e os resultados encontrados ficaram abaixo de 2,5 mg kg<sup>-1</sup> para histamina, entre 0,2 e 9,5 mg kg<sup>-1</sup> para putrescina e cadaverina, 6,5 a 47,9 mg kg<sup>-1</sup> para espermidina e 29,1 e 235,1 mgkg<sup>-1</sup> para espermina.

**Palavras-chave:** Aminas biogênicas; mortadela; UPLC-MS/MS; derivatização.

## ABSTRACT

Biogenic amines are compounds produced from the action of some microorganisms on amino acids and can be contaminants of some foods. Their formation may occur during the shelf life or storage of food and cause harm to human health when ingested. These compounds may be chemical indicators of in-kind food hygiene conditions and / or processing practices, since their formation is associated with the activity of contaminating micro-organisms. Meat and meat products are foods in which some biogenic amines occur frequently. The most widely used analytical methods for the determination of biogenic amines employ derivatization of the molecules so that they can be quantified by HPLC techniques with ultraviolet detectors or fluorescence. This work proposes to establish an analytical method to identify and quantify the biogenic amines putrescine, cadaverine, histamine, spermidine and spermine without the need for derivatization of these molecules. The technique used was ultra-high performance liquid chromatography followed by sequential mass spectrometry (UPLC-MS/MS), widely used in the detection of compounds present in low concentrations in complex matrices, since it allows an increase in the sensitivity and reduces the interference of compounds present in the matrix. Stationary phase C18 and mobile water and acetonitrile phases added with pentafluoropropionic acid (PFPA) were used in equipment with electrospray ionization and triploquadropolo analyzer. Recovery was obtained between 96.7 and 109.9%; of  $0.8 \text{ mg kg}^{-1}$  for spermidine and  $2.5 \text{ mg kg}^{-1}$  for spermine, and coefficients of variation between 0.4 and 5.6%. The results obtained in the validation showed that the developed method is suitable for mortadella analysis. This method was applied to the analysis of mortadella marketed in Campinas - SP, and the results were below  $2.5 \text{ mg kg}^{-1}$  for histamine, between  $0.2$  and  $9.5 \text{ mg kg}^{-1}$  for putrescine and cadaverine,  $6.5$  to  $47.9 \text{ mg kg}^{-1}$  for spermidine and  $29.1$  and  $235.1 \text{ mg kg}^{-1}$  for spermine.

**Key words:** biogenic amines; bologna; mortadella; UPLC-MS/MS; derivatization

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
Objetivo principal.....	3
Objetivos específicos .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
Características das aminas biogênicas .....	4
Legislação .....	6
Aminas biogênicas em alimentos .....	7
Mortadelas.....	13
Métodos para determinação de aminas biogênicas em alimentos .....	14
Preparo de amostra, extração e clean-up.....	15
Técnicas de separação e de detecção .....	16
Limites de detecção .....	17
Validação de métodos .....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
Material .....	18
Amostras.....	18
Reagentes e soluções .....	19
Equipamentos.....	19
Métodos .....	20
Ensaio preliminares para adequação das condições de separação e detecção das aminas biogênicas derivatizadas.....	20
Adequação das condições cromatográficas para análise das aminas biogênicas não derivatizadas.....	21

Validação da metodologia .....	21
Linearidade / Efeito matriz .....	22
Recuperação (exatidão).....	23
Precisão.....	23
Seletividade .....	23
Limite de detecção (LD).....	23
Limite de quantificação (LQ) .....	23
Adequação das condições para extração das aminas biogênicas nas mortadelas .....	24
Análise de aminas biogênicas em amostras de mortadela .....	24
Atividade de água, pH e análises microbiológicas em amostras de mortadela.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
Ensaio preliminares para adequação das condições de separação e detecção das aminas biogênicas derivatizadas.....	25
Método para aminas biogênicas não derivatizadas .....	27
Condições de extração .....	30
Validação do método para aminas biogênicas não derivatizadas .....	31
Avaliação de mortadelas de baixo custo.....	35
6. CONCLUSÕES .....	38
7. REFERÊNCIAS.....	40

## 1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, a exigência por alimentos saudáveis e a busca constante por qualidade e segurança dos alimentos tem estimulado a pesquisa e quantificação de compostos que possam afetar a saúde humana. As aminas biogênicas podem ser encontradas naturalmente, em baixas concentrações, em diversos alimentos como frutas e vegetais, onde estão presentes como produtos ou intermediários metabólicos e podem ter distintas funções fisiológicas, mas também podem apresentar efeitos tóxicos nos organismos (STADNIK; DOLATOWSKI, 2010).

A possibilidade de serem indicadoras de qualidade microbiológica e o potencial tóxico das aminas biogênicas, mesmo sendo fortemente influenciado pela capacidade de detoxificação dos indivíduos, são os dois principais motivos que levam os pesquisadores do mundo todo a analisar aminas biogênicas em alimentos (DADÁKOVÁ; KŘÍŽEK; PELIKÁNOVÁ, 2009). Além disso, estudos recentes mostram uma nova tendência de pesquisa onde o perfil de aminas biogênicas é mais uma fonte de dados analíticos para ser usada como descritor das características de qualidade de alimentos, sendo que algumas aminas biogênicas também estão relacionadas com propriedades organolépticas de alimentos. Desta maneira, as aminas biogênicas são analisadas em alimentos devido ao seu potencial de toxicidade e também por estarem relacionadas com a qualidade microbiológica do alimento, possibilitando uma avaliação desde as matérias primas até os produtos processados (ÖNAL, 2007). Portanto, é de suma importância que alimentos susceptíveis à ação de micro-organismos sejam estudados em relação à presença de aminas biogênicas.

Em 2015, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2015(b)) alertou sobre o risco de botulismo em mortadelas conservadas em temperatura ambiente. Segundo a legislação brasileira, mortadela é “o produto cárneo industrializado, obtido da emulsão de carnes de animais de açougue, acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas, e submetido ao tratamento térmico adequado”. As mortadelas podem ser classificadas de acordo com a composição

da matéria-prima e as mortadelas de baixo custo podem conter até 60% de carne mecanicamente separada, 10% de miúdos comestíveis e gorduras e também é permitido a adição de proteínas não cárneas e amido (BRASIL, 2000). Esta categoria de produto pode ser transportada e comercializada em temperatura ambiente desde que as exigências do Ofício-circular do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento sejam atendidas (BRASIL, 2015(b)).

Apesar da grande variedade e do contínuo desenvolvimento de métodos analíticos para análise de amins biogênicas, sempre existe o anseio de se obter técnicas que sejam rápidas, utilizem menores quantidades de reagentes e que apresentem resultados satisfatoriamente exatos e precisos. A implantação de métodos eficientes e validados para monitorar contaminantes em alimentos, com o propósito de garantir a qualidade e segurança alimentar, é de suma importância. Com base nesta consideração, o trabalho aqui exposto teve por objetivo validar uma metodologia para análise simultânea de cinco amins biogênicas em mortadela utilizando uma técnica moderna de análise (UPLC-ESI-MS/MS). Esta técnica é largamente empregada para detectar compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, uma vez que possibilita um aumento na detectabilidade das substâncias de interesse e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz, além de fornecer informação estrutural das moléculas alvo. (CHIARADIA, COLLINS & JARDIM, 2008).

## **2. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

- Estabelecer e validar um método analítico para identificar e quantificar putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina em mortadelas utilizando cromatografia líquida de “ultra alta” eficiência com detector sequencial de massas (UPLC-MS/MS).

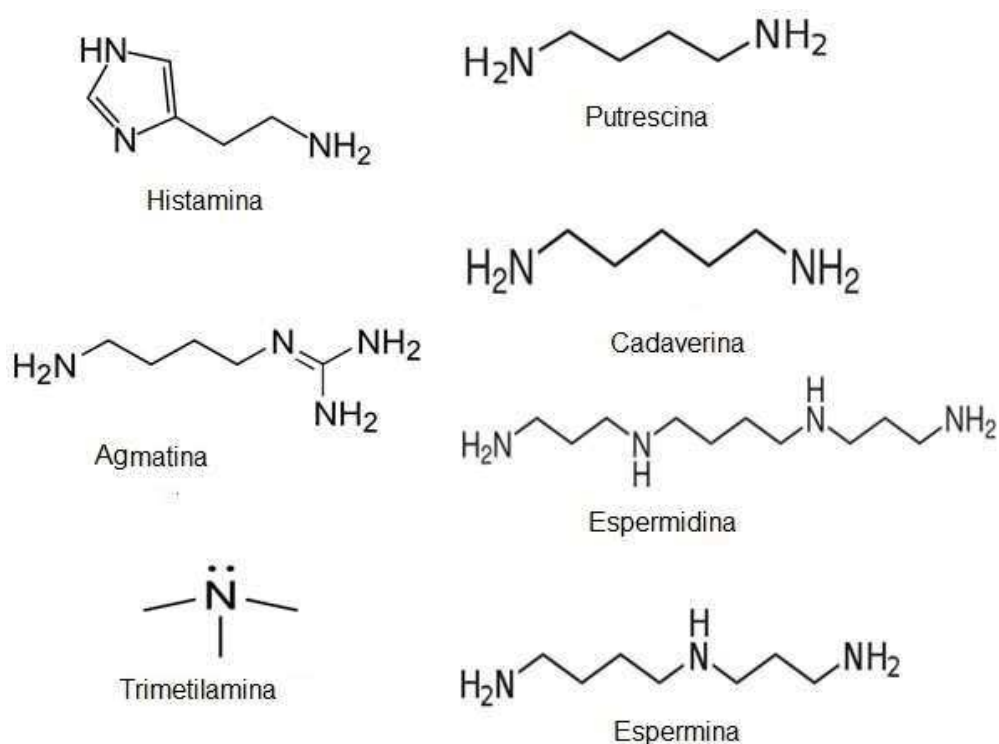
### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Adequar condições cromatográficas para separação simultânea das aminas biogênicas, preferencialmente sem derivatização;
- Simplificar a extração e limpeza para amostras de mortadela;
- Validar a metodologia segundo os requisitos do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO 2016);
- Determinar os teores de aminas biogênicas em amostras de mortadela de baixo custo adquiridas no comércio de Campinas, SP.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### CARACTERÍSTICAS DAS AMINAS BIOGÊNICAS

As aminas biogênicas são moléculas polares de origem biológica e de baixo peso molecular, que têm caráter básico e estão naturalmente presentes, em baixas concentrações, em alguns alimentos. São chamadas de aminas biogênicas quando sua formação ocorre a partir da degradação de aminoácidos por enzimas descarboxilases (BARDÓCZ, 1995). Podem ser classificadas do ponto de vista da estrutura química como: alifáticas (putrescina - PUT, cadaverina CAD, espermina - SPM e espermidina - SPD), aromáticas (tiramina - TY e feniletilamina - PHE) e heterocíclicas (histamina – HIS e triptamina - TRP) e de acordo com o número de grupos amínicos como monoaminas (HIS, TY, PHE, TRP), diaminas (PUT, CAD) e poliaminas (SPM e SPD) (BARDÓCZ, 1995; SENTELLAS et al., 2016). Exemplos de algumas estruturas de aminas biogênicas encontradas com frequência em alimentos estão apresentados na Figura 1.

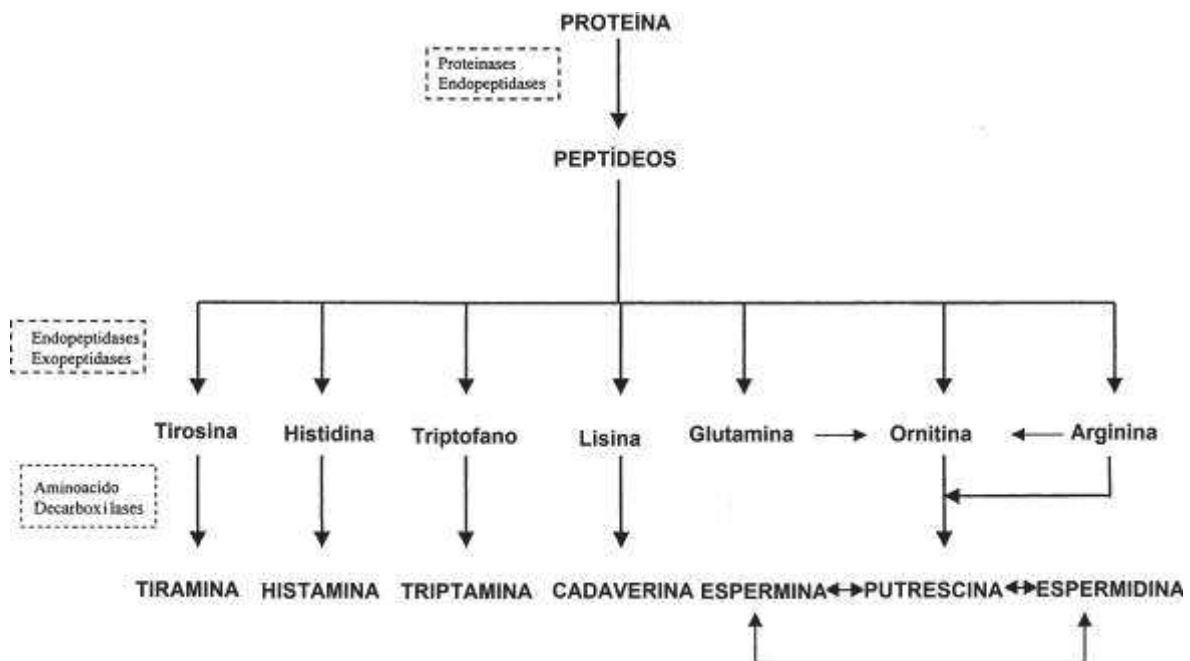


**Figura 1** – Estrutura química de aminas biogênicas frequentemente encontradas em alimentos (ÖNAL, 2007).



As aminas biogênicas são formadas pela descarboxilação de aminoácidos e os precursores e as respectivas aminas formadas estão apresentados na Figura 2.

Os efeitos das aminas biogênicas no organismo humano são desencadeados quando sua concentração no sangue atinge altos níveis. Isso pode ocorrer quando são ingeridas em grandes quantidades ou por diminuição da atividade das enzimas amino oxidases, que estão presentes no organismo humano e são responsáveis por inativar as aminas biogênicas. Os sintomas clínicos causados por aminas biogênicas dependem da quantidade e variedade das aminas ingeridas, da susceptibilidade e da capacidade de detoxificação de cada indivíduo. Em geral, não são observados efeitos crônicos devido à ação de aminas biogênicas, dado que a normalização dos seus níveis no organismo humano ocorre em um curto espaço de tempo. Pessoas com carência de vitamina B12, submetidas a tratamento com medicamentos inibidores de monoaminooxidases (IMAO), com problemas respiratórios ou cardíacos são particularmente mais sensíveis. Indivíduos com problemas gástricos normalmente possuem menor atividade oxidativa intestinal e também se encontram no grupo de risco (EFSA, 2011; BARDÓCZ, 1995).



**Figura 2.** Aminas biogênicas e seus aminoácidos precursores. (Adaptado de RUIZ-CAPILLAS; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2005)

Os sintomas resultantes da ação da histamina são observados principalmente sobre o sistema cardiovascular. A histamina é vasodilatadora, por isso causa urticária, hipotensão, dores de cabeça e palpitação. Em casos mais graves, podem ocorrer broncoespasmos, sufocamento e desordem respiratória severa. Também provoca sintomas gastrointestinais por agir sobre a musculatura lisa do intestino, causando dores abdominais, diarreia e vômitos. Dor e coceira associadas com urticária também podem ocorrer (CARDOZO et al., 2013). A tiramina, uma das principais aminas com característica vasoconstritora, pode provocar enxaqueca e crise hipertensiva em indivíduos sensíveis (STADNIK, DOLATOWSKI, 2010). Putrescina e cadaverina podem potencializar os efeitos tóxicos da histamina e tiramina (DADÁKOVÁ, KŘÍŽEK, PELIKÁNOVÁ, 2009). Algumas aminas biogênicas como putrescina, cadaverina, espermina e espermidina podem oferecer um risco toxicológico maior quando estão presentes em produtos cárneos que contém nitrito e nitrato, pois pode ocorrer a formação de nitrosaminas, que são compostos cancerígenos (ÖNAL, TEKKELI, ÖNAL, 2013).

Diversos fatores podem influenciar no tipo e quantidade de aminas biogênicas encontradas em um alimento, desde sua composição química, flora microbiana presente, temperatura de armazenamento e o tipo de embalagem (DADÁKOVÁ, KŘÍŽEK, PELIKÁNOVÁ, 2009). As condições para que haja formação de altos níveis de aminas biogênicas em alimentos depende da existência de aminoácidos livres, da presença de micro-organismos capazes de produzir descarboxilase e, condições favoráveis de crescimento e atividade microbiana. (VINCI *et al.*, 2011).

## **LEGISLAÇÃO**

Na legislação não são estabelecidos limites individuais para todas as aminas biogênicas encontradas em alimentos, com exceção da histamina, devido à sua toxicidade. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil estabelece o limite máximo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  para a presença de histamina no músculo de peixes de espécies pertencentes às famílias ricas em histidina (BRASIL, 1997). No Canadá e na Suíça, o limite máximo para histamina em peixes e produtos de peixe também é de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , enquanto na Austrália e Nova Zelândia a concentração máxima permitida é de  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  (BIJI, 2016). A

legislação europeia (CE, 2005) e o *Codex Alimentarius* (CODEX, 2014) estabelecem critérios de segurança apenas para histamina em pescados e o nível seguro adotado é de 200 mg kg<sup>-1</sup>. Nos Estados Unidos, o FDA preconiza que o nível máximo de histamina para o consumo seguro é 50 mg kg<sup>-1</sup>. Para valores acima de 50 e até 200 mg kg<sup>-1</sup>, devem ser tomadas providências e, se os níveis estiverem entre 200 e 1000 mg kg<sup>-1</sup>, o alimento será considerado tóxico (FDA, 2011).

## **AMINAS BIOGÊNICAS EM ALIMENTOS**

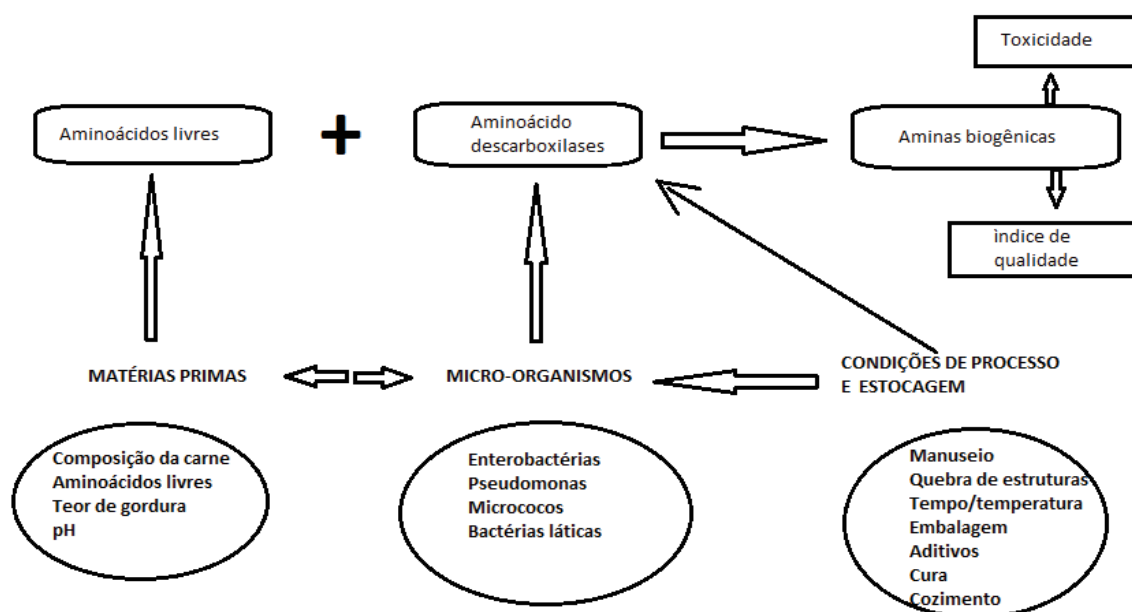
Qualquer alimento que contenha proteínas ou aminoácidos livres está sujeito à formação de aminas biogênicas, seja por atividade microbiana ou bioquímica. Os principais alimentos onde as aminas biogênicas podem ser encontradas em quantidades significativas são peixes e derivados, carnes e produtos cárneos, produtos lácteos, vinhos, cervejas, vegetais, frutas e chocolates (SANTOS, 1996). A presença de aminas biogênicas em diversos tipos de alimentos tem sido relatada e as de maior ocorrência são histamina, cadaverina, putrescina,  $\beta$ -feniletilamina, tiramina, triptamina, espermina e espermidina (STADNIK, DOLATOWSKI, 2010). As aminas biogênicas também podem ser encontradas em alimentos em processo de deterioração, principalmente em produtos de origem animal e também estão presentes em alimentos submetidos a processos fermentativos, desde que existam precursores para sua formação (SANTOS *et al.*, 2015; RAMOS *et al.*, 2014; BUNKA *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2017).

Diversos fatores podem influenciar no tipo e quantidade de aminas biogênicas encontradas em um alimento, desde sua composição química, flora microbiana presente, temperatura de armazenamento e o tipo de embalagem (DADÁKOVÁ, KŘÍŽEK, PELIKÁNOVÁ, 2009). A matéria prima de origem animal é uma fonte natural de substrato a partir do qual as aminas biogênicas são formadas, e também é o maior componente da matriz em que as reações de descarboxilação ocorrem, e como o perfil de aminas biogênicas é afetado pelas enzimas descarboxilases, pelos aminoácidos disponíveis e pelo ambiente onde esses componentes se encontram, qualquer alteração em um desses fatores vai

provocar variação nas quantidades e tipos de aminas biogênicas que se formam (STADNIK; DOLATOWSKI, 2010; RUIZ-CAPILLAS; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2005).

Nas carnes frescas de boa qualidade normalmente são encontradas espermidina e espermina, que raramente ultrapassam  $10 \text{ mgkg}^{-1}$ . Quando se utiliza matéria-prima de qualidade para manufatura de produtos processados, dificilmente haverá formação de outras aminas biogênicas ou essas serão encontradas em níveis muito baixos, se o armazenamento for adequado (KOUHNAVARD; FARHADI; REZAEI, 2015). Contudo, algumas aminas como tiramina, putrescina e cadaverina podem ser formadas durante a estocagem da carne. (STADNIK, DOLATOWSKI, 2010).

A fonte de substrato (aminoácidos) e o meio da reação são representados pela matéria prima e suas características (composição, pH, condições de manuseio) e as enzimas estão relacionadas com os tipos de micro-organismos presentes. Além desses fatores, há influência do tipo de produto (fresco, moído, reestruturado, defumado, fermentado, etc) e os processos tecnológicos empregados em sua fabricação, além das condições de armazenamento como temperatura, embalagem, etc (RUIZ-CAPILLAS; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2005), conforme resumo apresentado na Figura 3.



**Figura 3** – Fatores que influenciam a formação de aminas biogênicas em produtos cárneos. (Adaptado de RUIZ-CAPILLAS; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2005).

O pH é um fator importante que influencia a atividade das enzimas aminoácido descarboxilases. Sua diminuição resulta em aumento da atividade da descarboxilase das bactérias e, nessa condição, as bactérias produzem mais descarboxilases como parte do seu mecanismo de proteção. Por outro lado, as carnes que apresentam pH altos (carnes DFD – “Dark, Firm and Dry”), favorecem o crescimento de micro-organismos, aumentando os aminoácidos livres, mas limitam a atividade da descarboxilase. Condições que resultam em um baixo potencial de oxido-redução e estimulam a produção de histamina, pois a histidina descarboxilase parece ser inativada ou destruída na presença de oxigênio. A formação de aminas por bactérias é também influenciada pela temperatura, que entre 20°C e 37°C é ótima para o crescimento da maioria das bactérias que produzem descarboxilases (STADNIK; DOLATOWSKI, 2010; RUIZ-CAPILLAS; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2005).

O conteúdo de gordura das matérias primas cárneas também influencia a formação de aminas biogênicas. Estudos realizados principalmente com queijos, mostraram que conforme o teor de gordura aumenta, diminui a formação de aminas biogênicas. Atribui-se ao fato de que a gordura diminui a atividade de água, inibindo o crescimento de micro-organismos responsáveis pela descarboxilação dos aminoácidos. Também foi observado que histamina e tiramina estão menos presentes em produtos embalados de carne suína (presuntos crus e cozidos) do que em produtos mistos de carne bovina e suína (salames, mortadelas, salsichões), onde a formação de tiramina é predominante. (RUIZ-CAPILLAS; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2005).

A obtenção de produtos cárneos com baixas quantidades de aminas biogênicas requer não só a utilização de matérias primas de boa qualidade, mas também um processo adequado. O corte e moagem das carnes geralmente aumentam o risco de contaminação microbiológica e de formação de aminas biogênicas. A estocagem refrigerada em temperaturas impróprias, ou por tempo prolongado favorecem a formação de aminas biogênicas por aumentarem a proteólise da carne e o crescimento microbiano. Já o congelamento, geralmente não favorece que sejam formadas aminas biogênicas, pois, além de praticamente interromper o crescimento microbiano, torna as descarboxilases instáveis (RUIZ-CAPILLAS; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2005).

O tipo de processamento e de armazenamento de produtos cárneos pode influenciar na formação das aminas biogênicas. O tratamento térmico pode inativar as descarboxilases presentes, já que ocorre geralmente acima de 65°C. Sendo assim, as aminas biogênicas presentes em produtos cozidos são, na maioria das vezes, originárias das matérias primas e da manipulação prévia ao cozimento. Já em produtos fermentados, como salames, pode existir uma maior variedade e concentração de aminas biogênicas, devido à quantidade elevada de micro-organismos presentes e aminoácidos livres disponíveis decorrentes da proteólise que acontece durante o processo e da temperatura da fermentação, favorecendo a atividade de amino descarboxilases (RUIZ-CAPILLAS; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2005).

Com relação a aditivos usados em produtos cárneos, Naila *et al.* (2010) mostraram, em uma revisão, que o uso de conservadores pode reduzir a formação de aminas biogênicas. O conservador sorbato de sódio e o espessante hexametáfosfato de sódio podem retardar a formação de histamina e a utilização de ácido cítrico e succínico, e também sorbitol podem inibir a atividade da descarboxilase e a formação de histamina em pescado. Sorbato de potássio pode aumentar a vida útil de frutos do mar e, combinado com ácido ascórbico, pode reduzir a quantidade de aminas biogênicas formadas em linguças; nitrito e nitrato de sódio inibem a produção de aminas biogênicas em alguns estudos (NAILA *et al.*, 2010).

Grande parte dos estudos de incidência de aminas biogênicas está relacionada a peixes ou frutos do mar, e a histamina é a principal amina biogênica estudada. Fatores como a atividade enzimática endógena e a flora microbiana presente nos pescados fazem com que suas proteínas sejam mais susceptíveis à deterioração, liberando assim aminoácidos que serão matéria prima para formação de aminas biogênicas (ROMERO-GONZALEZ *et al.*, 2012; SENTELLAS *et al.*, 2016). Nos pescados da família *Scombridae* (atum, bonito, cavalinha) ocorre maior acúmulo de histamina devido à alta quantidade de histidina livre presente nos seus músculos, por isso são os pescados mais estudados (GOMES *et al.*, 2014).

Além desses estudos de incidência, pesquisas sobre a formação desses compostos e a influência do armazenamento na qualidade dos alimentos têm sido

realizadas, uma vez que os níveis de aminas biogênicas podem indicar deterioração do alimento (ROMERO-GONZALEZ *et al.*, 2012; SIROCCHI *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2009; KOUHNAVARD *et al.*, 2015).

Índices de avaliação de qualidade de produtos de origem animal de acordo com o perfil e o conteúdo de aminas biogênicas têm sido sugeridos por diversos estudiosos. Em 1977, MIETZ & KARMAS propuseram um “chemical quality index”, um índice que sugere o grau de deterioração de pescados baseado em uma equação que utiliza a concentração de aminas biogênicas presentes:

$$Index = \frac{histamina + putrescina + cadaverina}{1 + espermidina + espermina}$$

Em 1996, foi recomendado o *Biogenic Amines Index* (BAI), um índice de avaliação do frescor de carnes de acordo com a soma das concentrações de PUT, CAD, HIS e TY: < 5 mg kg<sup>-1</sup> sugere que a carne tem boa qualidade, níveis entre 5 e 20 mg.kg<sup>-1</sup> que a carne é aceitável mas existe sinais de deterioração, níveis entre 20 e 50 mg kg<sup>-1</sup> indicam uma qualidade ruim e > 50 mg kg<sup>-1</sup> indica que a carne está deteriorada (HERNÁNDEZ-JOVER *et al.*, 1996).

Em 2002, foi sugerida a relação entre a concentração de espermidina e espermina (SPD/SPM) para avaliar carne de frango. Os valores abaixo de 0,50 indicam um produto fresco, entre 0,50 e 0,70, o produto deve ser consumido imediatamente e acima de 0,70 o produto está em fase de deterioração avançada (SILVA; GLORIA, 2002).

Desta maneira, vários autores em diversos países, tem lançado mão desses índices para avaliar produtos disponíveis no comércio ou em estudos de vida útil de produtos cárneos (SIROCCHI *et al.*, 2014; ROMERO-GONZALEZ *et al.*, 2012, SIROCCHI *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2014). Além disso, devido a grande importância das aminas biogênicas na saúde pública, vários estudos de incidência dessas substâncias têm sido realizados, como por exemplo: em queijos (BUNKOVÁ *et al.*, 2013; REDRUELLO *et al.*, 2013; SPIZZIRRI *et al.*, 2013 ), em bebidas (DANIEL *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2012; ), em produtos cárneos (SIROCCHI *et al.*, 2014; KOUHNAVARD *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2017,

SANTOS *et al.*, 2015), dentre outros (GUIDI; GLORIA, 2012; DONG; XIAO, 2017; DEETAE *et al.*, 2017).

Em relação às concentrações de aminas biogênicas encontradas em produtos cárneos, os produtos submetidos à fermentação contêm maiores quantidades do que os frescos (ERIM, 2013). Os produtos fermentados, como os diversos tipos de salames, são objeto da maioria das pesquisas sobre formação de aminas biogênicas em produtos cárneos processados. Durante as etapas de maturação e fermentação de embutidos cárneos, proteases e peptidases da própria carne ou provenientes dos micro-organismos presentes causam transformações nas proteínas gerando aminoácidos livres que sofrem descarboxilação, produzindo monoaminas, diaminas ou poliaminas (GIROTTI *et al.*, 2010). Triptamina, histamina, cadaverina e putrescina são as aminas biogênicas mais presentes em produtos cárneos e estão associadas ao crescimento microbiano (KOUHNAVARD *et al.*, 2015).

Em estudo realizado por Bunka *et al.* (2012), onde foram analisados produtos cárneos fermentados durante a estocagem, valores da soma das concentrações de PUT, CAD, HIS e TY variaram, entre o início e final da estocagem, de “não detectado” até 395,3 mg kg<sup>-1</sup>, valor considerado crítico do ponto de vista toxicológico. A concentração de histamina em uma das amostras no final do armazenamento foi de 151,8 mg kg<sup>-1</sup> (BUNKA *et al.*, 2012).

No Brasil, Santos *et al.* (2015) avaliaram seis amostras comerciais de salame para tiramina, putrescina, cadaverina, espermidina, histamina e espermina e duas marcas apresentaram níveis de histamina acima de 100 mg kg<sup>-1</sup>, que é limite o máximo estabelecido no Brasil para peixes com alta concentração de histidina (BRASIL, 1997). Desta maneira, os autores sugeriram um monitoramento dessas substâncias nas indústrias e que sejam implementados padrões específicos para concentração de aminas biogênicas em salame na legislação do Brasil (SANTOS *et al.*, 2015)

Não são todos os micro-organismos que possuem capacidade de produzir enzimas que descarboxilam os aminoácidos, porém as bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *pediococcus*, *lactococcus* e *leuconostoc*), as enterobactérias (*Morganella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella* e *Shiguella*), *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *kocuria*



são conhecidas por exercerem atividade descarboxilase (GIROTTI, MASSON, HARACEMIV, 2010).

## **MORTADELAS**

A mortadela tem uma grande importância na economia nacional, pois é um dos produtos cárneos mais produzidos no Brasil, com volume estimado em aproximadamente 460 mil toneladas para 2017, ligeiramente inferior à produção de salsichas e linguiças (DATAMARK, 2017). No passado, a mortadela era sinônimo de alimento de baixo custo e era consumida principalmente pela população de baixa renda. Atualmente a mortadela tornou-se uma iguaria na gastronomia de boteco, dos mais sofisticados aos mais simples, e é consumida por todas as classes sociais.

Conforme anexo II da Instrução Normativa nº4 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2000), as mortadelas são classificadas em diferentes categorias em função das matérias-primas e ingredientes utilizados na sua formulação. Sua definição na Instrução Normativa nº 4 é: *“Entende-se por Mortadela, o produto cárneo industrializado, obtido de uma emulsão das carnes de animais de açougue, acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas, e submetido ao tratamento térmico adequado”*. São classificadas de acordo com a composição da matéria prima e das técnicas de fabricação:

**“Mortadela** - Carnes de diferentes espécies de animais de açougue, carnes mecanicamente separadas, até o limite máximo de 60%; miúdos comestíveis de diferentes espécies de animais de açougue (Estômago, Coração, Língua, Fígado, Rins, Miolos), pele e tendões no limite de 10% (máx) e gorduras.

**Mortadela Tipo Bologna** - Carnes Bovina e/ou suína e/ou ovina e carnes mecanicamente separadas até o limite máximo de 20%, miúdos comestíveis de bovino e/ou suíno e/ou ovino (Estômago, Coração, Língua, Fígado, Rins, Miolos), pele e tendões no limite de 10% (máx) e gorduras.

**Mortadela Italiana** – Porções musculares de carnes de diferentes espécies de animais de açougue e toucinho, não sendo permitida a adição de amido.

**Mortadela Bologna** – Porções musculares de carnes bovina e/ou suína e toucinho, embutida na forma arredondada, não sendo permitida a adição de amido.

**Mortadela de Carne de Ave** - Carne de ave, carne mecanicamente separada, no máximo de 40%, até 5% de miúdos comestíveis de aves (Fígado, Moela e Coração) e gordura”.

(Fonte: BRASIL, 2000)

Nas mortadelas de baixo custo, que tem a designação de venda “mortadela”, também podem ser adicionadas proteínas não cárneas e amido nos teores de, no máximo, 3,5% e 5%, respectivamente e ainda são acrescentadas de sal de cura, aceleradores de cura e condimentos. Essas mortadelas podem ser transportadas e conservadas em temperatura ambiente desde que o processo de cozimento assegure, no mínimo, a redução de seis ciclos Log (6D) do micro-organismo alvo e sua atividade de água (Aw) não ultrapasse 0,955 (BRASIL, 2015(b)).

## **MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM ALIMENTOS**

Devido às características químicas das moléculas de aminas biogênicas, da diversidade em suas estruturas químicas, aliado à complexidade das matrizes alimentícias e a presença das mesmas em concentrações muito baixas, a análise desses compostos tem um alto grau de dificuldade. Em alimentos que têm como base matérias primas de origem animal, onde existe alto teor de proteínas e gorduras, diversos ingredientes adicionados e vários tipos de processamento a que são submetidos, analisar aminas biogênicas é um grande desafio (GOMES *et al.*, 2014). Como esses compostos não apresentam propriedades que permitam detectá-los diretamente por absorção no visível, ultravioleta ou fluorescência, existe a necessidade de derivatização química para que sejam analisados nesses detectores. A espectrometria de massas vem sendo introduzida como técnica para detecção de aminas biogênicas em alimentos, devido a apresentar vantagens em relação a informações que podem ser obtidas sobre a estrutura

química, a massa molar e aumento na seletividade (BOMKE, *et al.*, 2009; ROMERO-GONZALEZ *et al.* 2012).

No Brasil, o método oficial para determinação de histamina, cadaverina, putrescina, espermidina, espermina está descrito na Instrução normativa nº 25, de 2 de junho de 2011, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e é recomendado para análise de pescados frescos, curados ou em conserva. Esse procedimento utiliza extração com ácido perclórico, derivatização com cloreto de dansila, separação por cromatografia líquida em fase reversa e detecção por ultravioleta (BRASIL, 2011).

Independente da metodologia a ser utilizada para determinação de aminas biogênicas, devem ser seguidas as seguintes etapas: preparo da amostra, extração, limpeza (“clean up”), separação, detecção e quantificação. Além disso, é necessário garantir que as características de desempenho do método sejam alcançadas demonstrando que o procedimento utilizado é apropriado, desta maneira faz-se necessária uma série de verificações na metodologia. Essas verificações quando realizadas em conjunto são conhecidas como validação da metodologia. Os principais parâmetros que devem ser utilizados são: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, sensibilidade, recuperação, exatidão e precisão (INMETRO, 2016).

### ***Preparo de amostra, extração e clean-up***

O preparo da amostra, a extração das aminas biogênicas e a limpeza dos extratos são etapas críticas na determinação das aminas biogênicas, pois além da alta complexidade da matriz alimentícia, a alta polaridade das moléculas, interferentes com similaridade estrutural em quantidades consideráveis e diversidade das moléculas, as aminas biogênicas estão presentes em concentrações muito baixas. Se essas etapas não forem adequadas para se extrair completamente as aminas biogênicas da matriz, a baixa recuperação refletirá diretamente na precisão da metodologia (ORDÓÑEZ *et al.*, 2016; ÖNAL, TEKKELI, ÖNAL, 2013). Os solventes extratores mais utilizados são soluções ácidas diluídas como clorídrico, perclórico, tricloroacético, dentre outros (SANTOS *et al.*, 2015; ROMERO-GONZALEZ *et al.*, 2012; TRIKI *et al.*, 2012; SIROCCHI *et al.*, 2014). A limpeza dos extratos baseadas em técnicas que utilizam quantidade

reduzida de solventes como micro extração líquido-líquido (ALMEIDA *et al.*, 2012; TODOROKI *et al.*, 2014), QuEChERS (JIANG *et al.* 2016; DONG; XIAO, 2017), extração em fase sólida (GIANOTTI *et al.* 2008, SIROCCHI *et al.*, 2014) tem sido largamente utilizada e tem a vantagem de ser efetiva a um custo relativamente baixo.

### ***Técnicas de separação e de detecção***

Diversas técnicas de separação, tais como cromatografia a gás, cromatografia líquida, eletroforese capilar, dentre outras têm sido empregadas para separação e quantificação das aminas biogênicas. Embora a cromatografia líquida em fase reversa seja a mais utilizada, coluna de interação hidrofílica (HILIC) tem sido introduzida com grandes vantagens. Devido às aminas biogênicas absorverem fracamente no ultravioleta e não possuírem fluorescência, é necessário que seja realizada reação de derivatização para aumentar a sensibilidade e seletividade do método. Essa reação pode ser realizada antes ou depois da separação na coluna cromatográfica e os reagentes mais utilizados são o o-ftaldialdeído (OPA) e o cloreto de dansila e com menor utilização o cloreto de benzoíla, fluorescamina, cloreto de dabsila, dentre outros (ÖNAL, TEKKELI, ÖNAL, 2013). Recentemente, a espectrometria de massas tem sido empregada em análises de aminas biogênicas, com e sem derivatização, em diversas matrizes (DANG *et al.*, 2013; VINCI *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011). O benefício de se derivatizar as aminas biogênicas para detecção por massas é, principalmente, o aumento da intensidade no sinal e a ionização das moléculas das aminas biogênicas derivatizadas é mais efetiva (LEE *et al.*, 2011; ERIM, 2013). Embora exista a vantagem da ionização das moléculas ser mais eficaz, a etapa de derivatização eleva o tempo da análise, o que é uma desvantagem para análises de rotina.

Em um estudo comparativo entre detecção no ultravioleta (HPLC-UV) com derivatização e espectrometria de massas (LC-MS) sem derivatização foi demonstrado que o método LC-ESI-MS teve a sensibilidade significativamente melhor com limites de detecção bem menores que os obtidos por HPLC-UV, além de melhor exatidão e menor tempo de análise (VINCI *et al.*, 2011). Para determinação de histamina em pescados, a metodologia HILIC acoplada à

espectrometria de massas teve um desempenho superior com exatidão e sensibilidade adequadas e tempo de análise muito inferior ao método com detecção por fluorescência, que utiliza derivatização (YOSHIDA *et al.*, 2012).

### **Limites de detecção**

Os limites de detecção reportados na literatura variam de acordo com a técnica de detecção utilizada e do tipo de matriz.

Em estudo realizado Alves *et al* (2017) foram analisadas oito aminas biogênicas em amostras de linguiças fermentadas e os autores utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e reação de derivatização com cloreto de dansila o limite de detecção ficou entre 0,45 e 0,85 mg Kg<sup>-1</sup>.

No trabalho de Sirocchi *et al.* (2014) foram analisadas dez aminas biogênicas em amostras de carne e a detecção e quantificação foi por espectrometria de massas. Foram comparados dois tipos de analisadores (*ion trap* e triplo quadrupolo) e os resultados obtidos no triplo quadrupolo apresentaram melhor seletividade e sensibilidade em relação ao *ion trap*. Os limites de detecção variaram de 0,03 a 0,3 mg L<sup>-1</sup> e 0,002 a 0,1 mg L<sup>-1</sup> para *ion trap* e triplo quadrupolo, respectivamente, possibilitando o controle de qualidade de carnes através dos índices baseados nas concentrações de algumas aminas biogênicas (SIROCCHI *et al.*, 2014).

Uma metodologia para análise de nove aminas biogênicas em carne suína fresca, embutido fermentado e salsicha baseada em separação por troca iônica e derivatização pós-coluna com detecção por fluorescência apresentou limites de detecção entre 0,03 e 0,10 mg mL<sup>-1</sup> (TRIKI *et al.*, 2012).

O estudo realizado por Sacconi *et al.* (2005) para avaliação de aminas biogênicas em carnes frescas e produtos cárneos apresentou faixa de linearidade entre 0,25 e 25 g mL<sup>-1</sup> e os limites de detecção variaram entre 9 e 34 g L<sup>-1</sup> para agmatina e espermidina, respectivamente. Essa metodologia utilizou detector de massas e para as amostras de carne as recuperações ficaram entre 85 e 97% enquanto a precisão ficou entre 4,5 e 9,7%.

## **Validação de métodos**

Para que possamos garantir que as características de desempenho de um método sejam alcançadas e para demonstrar que o procedimento utilizado é apropriado, é realizado um conjunto de verificações chamado de validação. Vários organismos reguladores internacionais e nacionais definem o termo validação. A ANVISA, no guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, preconiza que “o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida” e que “a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA, 2003). O documento orientativo do INMETRO engloba definições de várias normas, dentre elas a ABNT NBR ISO/IEC 17025 e VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia) e exprime que a validação tem como objetivo a confirmação de que os métodos são apropriados para o uso pretendido (INMETRO, 2016). Independente do documento, os guias recomendam que a metodologia seja validada com base nos seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, sensibilidade, recuperação, exatidão e precisão (INMETRO, 2016; DG-SANTE, 2016; THOMPSON *et al.*, 2002).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **MATERIAL**

#### ***Amostras***

As amostras estudadas foram adquiridas ao acaso em supermercados da região de Campinas-SP. Foram avaliadas 23 amostras de mortadelas de baixo custo provenientes de 16 fabricantes distintos. As amostras foram analisadas na data final da validade descrita no rótulo, que corresponde a 60 dias da data de fabricação. No período entre a aquisição e a análise essas amostras foram armazenadas em câmara à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Na ocasião da análise, as amostras foram trituradas até completa homogeneização utilizando-se um processador de alimentos doméstico e então imediatamente analisadas.

## **Reagentes e soluções**

Os padrões analíticos, todos com pureza superior a 99% e na forma de sais cloridratos, cadaverina, espermina, espermidina, histamina e putrescina foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Foram preparadas soluções padrão estoque individuais na concentração  $1 \text{ mg L}^{-1}$  em ácido clorídrico 0,1M. As soluções padrão de trabalho foram obtidas por diluição adequada em água purificada pelo sistema Milli-Q® (Millipore).

Os reagentes cloreto de dansila, L-prolina, bicarbonato de sódio, acetato de amônio e os ácidos clorídrico, perclórico, tricloroacético, pentafluoropropiônico (PFPA) e fórmico utilizados foram de grau analítico. Acetonitrila e metanol de grau cromatográfico foram utilizados para o preparo das fases móveis e, assim como os extratos das amostras, foram filtrados através de membranas com poro de  $0,22 \mu\text{m}$  (Millipore). A água ultrapura foi obtida em sistema Milli-Q® (Millipore).

## **Equipamentos**

O equipamento utilizado para a determinação das aminas biogênicas em mortadelas foi um cromatógrafo de ultra eficiência, modelo Acquity TM, Waters (USA), equipado com sistema de bombeamento quaternário, injetor automático e acoplado a um espectrômetro de massas tipo triploquadropolo com interface por *electrospray* (UPLC-ESI-MS/MS) modelo Xevo® TQD, Waters (USA). O sistema foi controlado pelo software MassLynx, que também administrou o sistema de aquisição e tratamento de dados. A separação das aminas biogênicas foi realizada em uma coluna cromatográfica híbrida de fase reversa Acquity UPLC®BEH (ethylene bridged hybrid) C-18 (100 mmx 2,1 mm,  $1,7 \mu\text{m}$ ) da marca Waters.

Foram utilizados equipamentos de uso comum em laboratório: balanças (analítica e semi analítica), banho ultrassônico, centrífuga com refrigeração, purificador de água MilliQ®, medidor de atividade de água e potenciômetro.

## MÉTODOS

### ***Ensaio preliminares para adequação das condições de separação e detecção das aminas biogênicas derivatizadas***

Foram realizados testes para separação e detecção das aminas biogênicas derivatizadas. Os padrões de putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina foram derivatizados com o reagente cloreto de dansila de acordo com o método preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011). Para tanto foram pipetadas alíquotas adequadas de cada padrão na concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  para tubo de 15 mL, completou-se o volume para 10 mL com ácido perclórico 0,2 M e foi realizada agitação em vórtex por 30 segundos. Foram retirados 0,2 mL dessa mistura e adicionou-se 0,4 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. Homogeneizou-se o conteúdo e adicionou-se 0,8 mL da solução de cloreto de dansila ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). O extrato foi novamente agitado e aquecido por 5 minutos em banho a  $60^\circ\text{C}$  ao abrigo da luz. Adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de L-prolina ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) e agitou-se a solução que foi mantida ao abrigo da luz durante 30 minutos. Em seguida adicionou-se 1 mL de tolueno e agitou-se por 1 minuto. A solução foi centrifugada e filtrada em membrana 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) para posterior injeção no espectrômetro de massas.

A fim de determinar os parâmetros de ionização de cada amina biogênica, foram realizadas infusões direta e individual, no espectrômetro de massas, de cada padrão derivatizado. Para obtenção das massas/carga ( $m/z$ ) dos íons precursores e dos íons produto, bem como os melhores parâmetros de ionização de cada composto como voltagem do cone e energias de colisão, foi utilizado monitoramento de reação selecionada (*SRM – Select Reaction Monitoring*), onde os dados são adquiridos somente para os íons produto específicos produzidos por íons precursores de  $m/z$  selecionados em um estágio prévio no espectrômetro de massas (VESSECCHI, 2011).

Para avaliar a separação cromatográfica adequada das aminas biogênicas derivatizadas foram testadas fases móveis descritas na literatura e compostas por metanol + água (50:50), acetonitrila + água (50:50) em condições isocráticas. Também foram testados gradientes contendo acetonitrila + acetato de amônio 20



mM acidificado com 0,1 % de ácido fórmico e pH 3,5 ajustado com ácido acético e gradientes de acetonitrila e água. Os testes foram realizados injetando-se solução padrão contendo todas as aminas biogênicas estudadas nesse trabalho.

### ***Adequação das condições cromatográficas para análise das aminas biogênicas não derivatizadas***

Tendo em vista a simplificação da metodologia foram realizados testes com as moléculas sem derivatização. As massas dos íons moleculares das aminas biogênicas não derivatizadas, assim como as condições de detecção e fragmentação de cada uma das aminas estudadas, também foram determinadas através do procedimento de infusão direta e monitoramento de reação selecionada (SRM – Select Reaction Monitoring).

Os testes para separação das aminas biogênicas não derivatizadas foram baseados no trabalho de Häkkinen *et al* (2007) que utiliza fase móvel adicionada do reagente modificador iônico ácido pentafluoropropiônico (PFPA) 0,1%.

A separação das aminas biogênicas foi realizada em sistema UPLC-ESI-MS/MS com coluna cromatográfica Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C-18. A fase móvel foi composta por acetonitrila e água ultrapura contendo PFPA 0,1% e vazão de 0,35 mL min<sup>-1</sup>. Foi utilizado gradiente composto inicialmente por 100 % da fase aquosa contendo PFPA 0,1%. Esse gradiente está apresentado na Tabela 5. O término da corrida cromatográfica se deu em 4,5 minutos e o sistema não necessitou de reequilíbrio. A coluna foi mantida a temperatura de 25°C, o injetor a 15°C e o volume de injeção foi de 2 µL. As condições para o espectrômetro de massas foram: nitrogênio como gás de dessolvatação, com fluxo de 700 L h<sup>-1</sup> e temperatura de 600 °C, e argônio como gás de colisão.

### **VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA**

A metodologia foi validada, tomando-se como base os requisitos do documento orientativo do INMETRO DOQ-CGCRE-008 revisão 5, do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos - RE 899 da ANVISA e do manual de garantia da qualidade analítica do MAPA (BRASIL, 2015(a)).

Para validação do método foram avaliados os parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

### **Linearidade / Efeito matriz**

A linearidade de um procedimento corresponde à habilidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (INMETRO, 2016).

O efeito matriz pode ser definido como o fenômeno observado que pode causar um aumento ou diminuição da resposta do detector para um analito presente no extrato da amostra comparado ao mesmo analito em solvente orgânico (THOMPSON *et al*, 2002; INMETRO, 2016).

A linearidade foi avaliada com a construção de três curvas de calibração em extrato de amostra (curva na matriz) e em HCl 0,01 M (curva no solvente). As faixas lineares estudadas foram: 0,02 a 2,0; 0,02 a 1,0; 0,02 a 2,5; 0,25 a 7,0 e 2,5 a 7,0 mg L<sup>-1</sup> para putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina, respectivamente.

A linearidade do método foi avaliada a partir da equação da regressão linear determinada pelo método dos mínimos quadrados ordinários. O coeficiente de correlação linear (r) foi usado como parâmetro para avaliar a adequação da reta como modelo matemático (ANVISA, 2003).

A avaliação do efeito matriz foi realizada através da comparação dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas de cada analito, teste F e teste t. Para o Teste F, considerou-se que se o valor de F calculado era menor que o valor de F tabelado, não existia diferença significativa entre as variâncias residuais e que as mesmas eram iguais. Neste caso, a matriz não teria efeito sobre a precisão do método na faixa de estudo avaliada. Já o teste t foi aplicado após cálculo do desvio padrão agrupado, considerando que se o valor de t calculado fosse menor que o valor de t tabelado, a matriz não afetaria o ensaio. (INMETRO, 2016; THOMPSON *et al*, 2002).

### ***Recuperação (exatidão)***

A exatidão do método foi avaliada através de estudos de recuperação, em três replicatas, realizado através de adição de padrão em amostra de mortadela antes da extração dos analitos. Os níveis estudados foram 0,2; 5,0 e 30 mg kg<sup>-1</sup> para putrescina e cadaverina, já para histamina, espermidina e espermina os níveis foram 0,2; 5,0 e 50 mg kg<sup>-1</sup>.

### ***Precisão***

A precisão sob condição de repetitividade foi avaliada através de ensaios de recuperação, em 3 concentrações diferentes, 5 replicatas sob as mesmas condições, no mesmo dia.

### ***Seletividade***

A seletividade foi considerada qualitativamente pela observação dos cromatogramas de determinada amostra comparando-se com a mesma amostra fortificada com padrões das aminas analisadas e com os padrões em solvente (ANVISA, 2003).

### ***Limite de detecção (LD)***

O limite de detecção foi determinado por percepção visual, através da análise de amostras com concentrações conhecidas de analito que podiam ser detectadas com confiança.

### ***Limite de quantificação (LQ)***

O limite de quantificação foi estabelecido pelo menor nível de fortificação onde se obteve exatidão adequada.

## ***Adequação das condições para extração das aminas biogênicas nas mortadelas***

Com o objetivo de simplificar ao máximo a extração e o procedimento para limpeza dos extratos foram realizados testes baseados no método preconizado pelo MAPA (2011) e em métodos reportados na literatura (SANTOS et al., 2015; ROMERO-GONZALEZ et al., 2012; TRIKI et al., 2012; SIROCCHI et al., 2014). As aminas biogênicas são facilmente extraídas de produtos cárneos com soluções de ácidos devido ao seu caráter básico. A fim de se obter uma extração eficiente e extratos livres de interferentes, foram testadas as soluções de ácidos perclórico 0,2 M, clorídrico 0,1 M e tricloroacético 5%. Também foram avaliadas diversas proporções entre massa de amostra e volume de solução extratora (1:5, 1:10 e 1:20) descritos na literatura. A escolha foi feita baseada em características dos picos cromatográficos.

## ***Análise de aminas biogênicas em amostras de mortadela***

As amostras coletadas nos supermercados de Campinas – SP foram analisadas, em triplicata, para quantificação de putrescina, cadaverina, histamina, espermina e espermidina e o procedimento utilizado está descrito a seguir:

Em tubo de centrífuga de 50 mL pesou-se 1,00 g de amostra recentemente homogeneizada e adicionou-se 10 mL de solução aquosa de ácido tricloroacético 5%. O tubo foi agitado em vortex por 2 minutos e em seguida centrifugado por 15 minutos a 5500 g em temperatura de 4°C. Uma alíquota de aproximadamente 1 mL do sobrenadante foi filtrada em membrana 0,22µm e transferido para frasco âmbar para posterior injeção no UPLC.

## ***Atividade de água, pH e análises microbiológicas em amostras de mortadela***

Para verificar o atendimento ao ofício circular do MAPA (BRASIL, 2015(b)) em relação à atividade de água ( $A_w$ ), as amostras também foram analisadas para esse parâmetro. Foi utilizado o equipamento AquaLab 4TE, que tem por princípio a técnica do ponto de orvalho, onde a pressão de vapor da amostra é equilibrada

com a umidade relativa do ar da câmara e detectada pela condensação do vapor no espelho da câmara fechada.

Também foram realizadas a contagem de bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias (SALFINGER & TORTORELLO, 2015), enterobactérias (KORNACKI *et al.*, 2015) e bactérias lácticas (ISO 15214:1998), além da medida do pH em potenciômetro por inserção direta do eletrodo na amostra.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ***Ensaio preliminares para adequação das condições de separação e detecção das aminas biogênicas derivatizadas***

A metodologia utilizada para derivatizar as aminas biogênicas mostrou-se adequada. As condições de aquisição obtidas da infusão dos padrões no espectrômetro de massas para as aminas derivatizadas com cloreto de dansila estão apresentadas na Tabela 1. Nessas condições foram obtidos um íon precursor e dois íons produto específicos para cada amina biogênica analisada, em diferentes tempos de retenção, possibilitando a confirmação da identificação desses analitos e sua quantificação através da aplicação do monitoramento de reações múltiplas (MRM), no qual o monitoramento de reação é selecionado para múltiplos íons produto provenientes de um ou mais íons precursores (VESSECCHI, 2011).

**Tabela 1 - Parâmetros da detecção das AB derivatizadas com cloreto de dansila**

Amina Biogênica	$t_R$ min	Íon precursor m/z	Energia Capilar kV	Íon produto 1 m/z	Energia cone V	Energia Colisão V	Íon produto 2 m/z	Energia Cone V	Energia Colisão V
Putrescina	3,49	555,50	3,50	170,10	50,00	40	234,10	50,00	30,00
Cadaverina	3,50	569,50	3,50	170,20	50,00	37	234,20	50,00	31,00
Histamina	3,56	578,50	3,50	170,10	50,00	30	234,10	50,00	30,00
Espermidina	4,09	845,70	3,50	170,10	50,00	50	360,30	55,00	45,00
Espermina	4,54	1135,90	3,50	170,10	80,00	100	360,40	80,00	90,00

$t_R$ : tempo de retenção; m/z: relação massa/carga; V: volts

Com os parâmetros de detecção definidos, os testes para separação cromatográfica das AB foram iniciados. As fases acetonitrila + água e metanol + água em sistema isocrático não foram adequadas, pois houve co-eluição das aminas, acarretando em sobreposições de picos, o que impossibilitou uma identificação adequada.

Já os gradientes testados para a fase móvel acetonitrila + acetato de amônio 20 mM apresentaram melhor desempenho, possibilitando a identificação e quantificação dos analitos. O gradiente com adição de 0,1% de ácido fórmico baseado no trabalho de Lee *et. al* (2011), e descrito na Tabela 2, proporcionou melhor resolução dos compostos, porém os picos da putrescina, cadaverina e histamina não apresentaram resolução adequada.

**Tabela 2. Gradiente da fase móvel para a separação das aminas biogênicas derivatizadas**

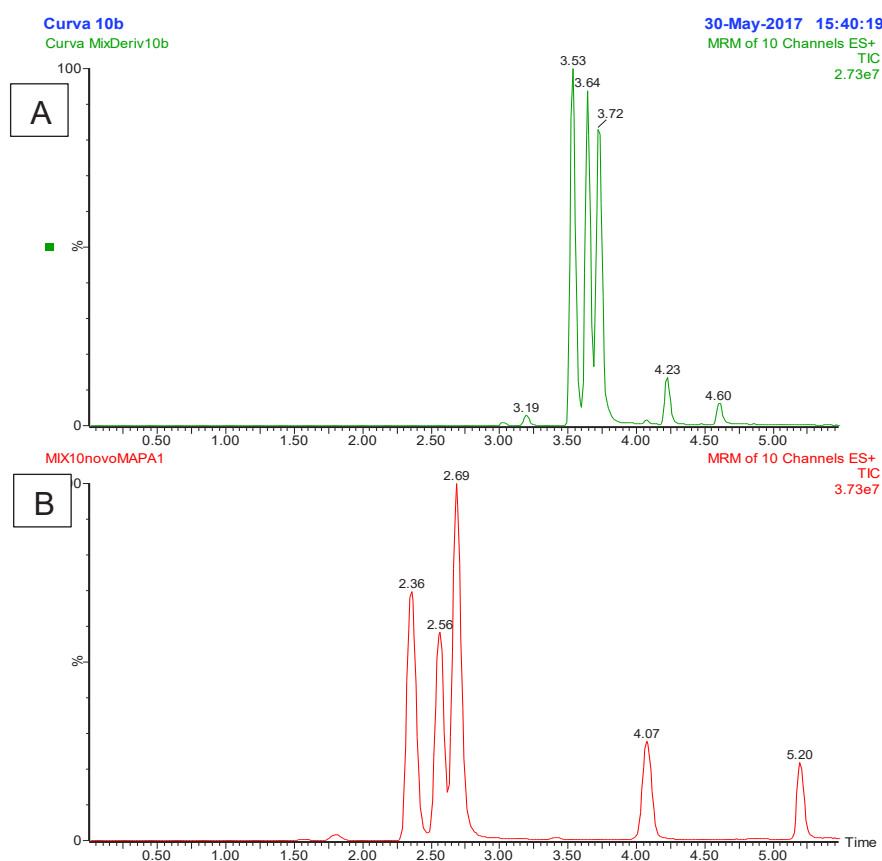
Tempo (minuto)	Acetato de amônio 20mM em ácido fórmico 0,1% (%)	Acetonitrila em ácido fórmico 0,1% (%)
0	70	30
3,5	0	100
5,0	0	100
5,5	70	30

Também foi testada a conversão do gradiente do método preconizado pelo MAPA (BRASIL, 2011), e desenvolvido para análise em cromatografia líquida de alta eficiência, para coluna de ultra eficiência. Essa adaptação do método foi feita através do programa Acquity Columns Calculator (Waters), que converte o gradiente dos métodos que utilizam HPLC para utilização em UPLC. O gradiente resultante dessa adequação e alteração onde as 2 fases móveis foram adicionadas de 0,1% de ácido fórmico, estão apresentados na Tabela 3. Nesse experimento o injetor automático e a coluna cromatográfica foram mantidos a 25 e 40°C, respectivamente. Nessas condições e com vazão da fase móvel de 0,2 mLmin<sup>-1</sup> foi obtida melhor resolução do que o teste anterior.

**Tabela 3. Gradiente da fase móvel para a separação das amins biogênicas após uso do programa “Acquity Columns Calculator”**

Tempo (minuto)	Água com 0,1% ácido fórmico (%)	Acetonitrila com 0,1% ácido fórmico (%)
0	40	60
2,7	25	75
4,3	25	75
6,0	5	95
6,5	5	95
7,0	40	60

Os cromatogramas MRM resultantes dos testes com as fases móveis e gradientes descritos nas tabelas 2 e 3 estão apresentados na Figura 4.



**Figura 4** – Cromatogramas MRM referentes às cinco amins biogênicas analisadas utilizando fases móveis água e acetonitrila: (A) gradiente descrito na Tabela 2 e (B) gradiente descrito na Tabela 3.

### ***Método para amins biogênicas não derivatizadas***

As condições de aquisição obtidas da infusão dos padrões no espectrômetro de massas para as amins não derivatizadas estão apresentadas

na Tabela 4. Nessas condições foram monitorados um íon precursor e dois íons produto específicos para cada amina biogênica analisada. Os parâmetros encontrados são concordantes, entre outros autores, com os obtidos por Romero-Gonzalez (2012), Gianotti (2008), Sagratini (2013) e Sirocchi (2014).

**Tabela 4. Parâmetros da detecção das AB não derivatizadas**

Amina Biogênica	$t_R$ (min)	Íon precursor m/z	Energia Capilar kV	Íon produto 1 m/z	Energia cone V	Energia Colisão V	Íon produto 2 m/z	Energia Cone V	Energia Colisão V
Putrescina	1,4	89,2	0,3	72,0	15,0	8,0	48,0	15,0	5,0
Cadaverina	1,8	103,1	0,3	86,1	15,0	9,0	69,0	15,0	15,0
Histamina	1,9	112,1	0,3	95,0	23,0	14,0	83,0	23,0	13,0
Espermidina	2,8	146,1	0,3	72,0	23,0	15,0	112,0	23,0	13,0
Espermina	3,3	203,2	0,3	129,1	23,0	12,0	112,1	23,0	18,0

$t_R$ : tempo de retenção; m/z: massa/carga; V: voltagem

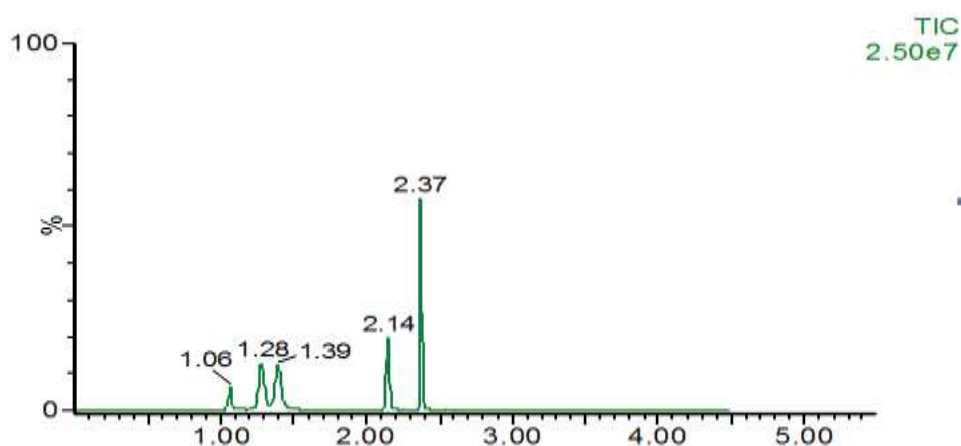
Em relação à separação cromatográfica, as metodologias disponíveis na literatura indicam que as melhores colunas para separação das AB não derivatizadas em matrizes alimentícias são as de interação hidrofílica (HILIC) devido à polaridade das moléculas. Em estudo sobre metabolismo de poliaminas, Häkkinen *et al.* (2007) descrevem a utilização de fase móvel com modificadores iônicos para a separação de AB não derivatizadas e separação em coluna C18. Nesse trabalho foram utilizados como modificadores iônicos, entre outros, ácido pentafluoropropiônico (PFPA) e ácido heptafluorobutírico (HFBA, 99%). Com a utilização do modificador HFBA na fase móvel, foi possível observar melhora na resolução.

**Tabela 5. Gradiente da fase móvel para a separação das aminas biogênicas não derivatizadas utilizando modificador iônico**

Tempo (minuto)	Água com 0,1% PFPA (%)	Acetonitrila com 0,1% PFPA (%)
1,0	100	0
2,0	70	30
3,5	80	20
4,2	100	0
4,5	100	0

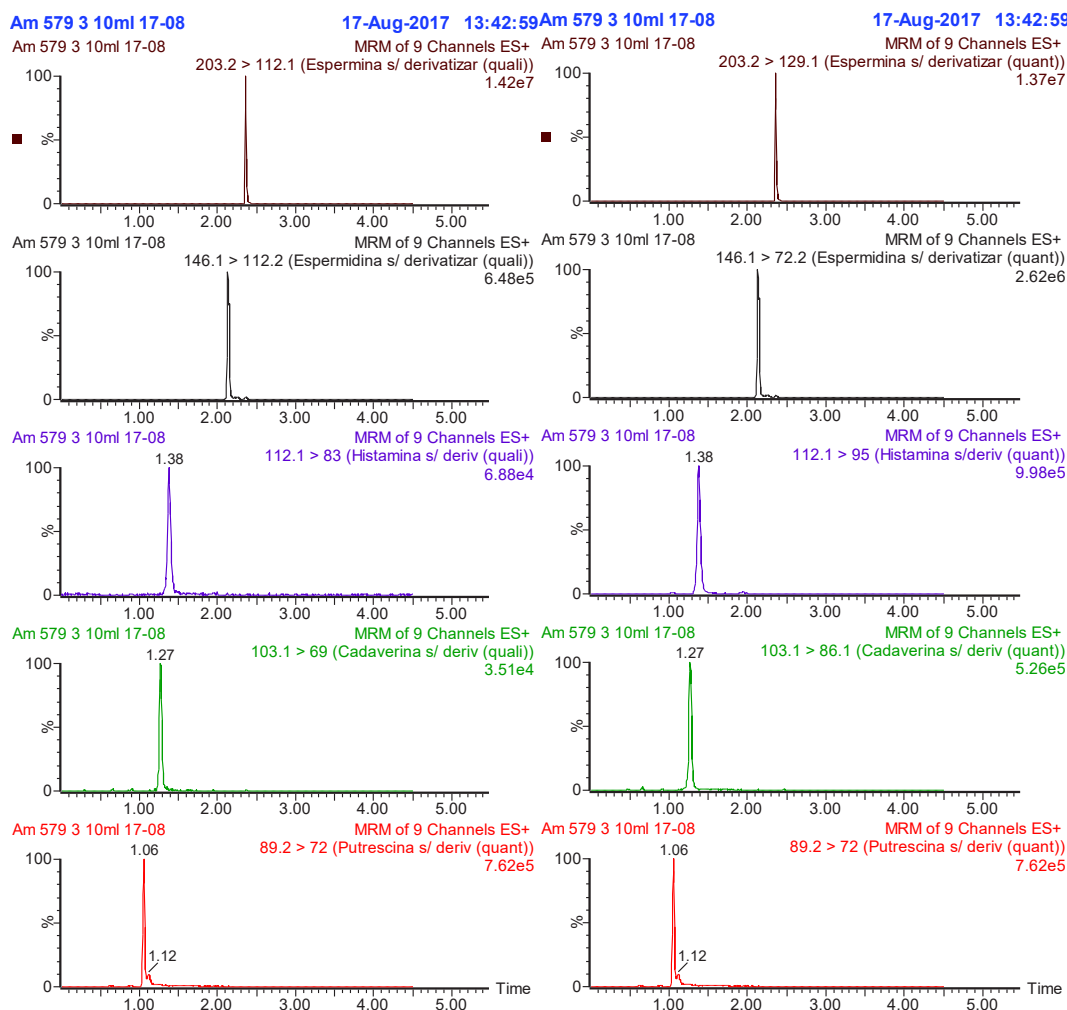


A adição do reagente modificador volátil ácido pentafluoropropiônico (PFPA), nas fases móveis usadas na análise das aminas biogênicas sem derivatização possibilitou resolução satisfatória das aminas biogênicas em coluna C18, mesmo sendo estes compostos muito polares (Figura 5). O uso de reagentes “pareadores de íons” é citado por Vince (2011) com intenção de promover a separação adequada de moléculas polares, como as aminas biogênicas, por cromatografia líquida de fase reversa em coluna C18. Esses reagentes aumentam a interação entre as cargas positivas das aminas e as cargas negativas da coluna e têm como requisito serem voláteis e permitirem retenção suficiente para separação, com mínima concentração para evitar supressão de sinal.



**Figura 5** – Cromatograma (TIC) das cinco aminas biogênicas analisadas utilizando fases móveis água e acetonitrila adicionadas do modificador iônico PFPA.

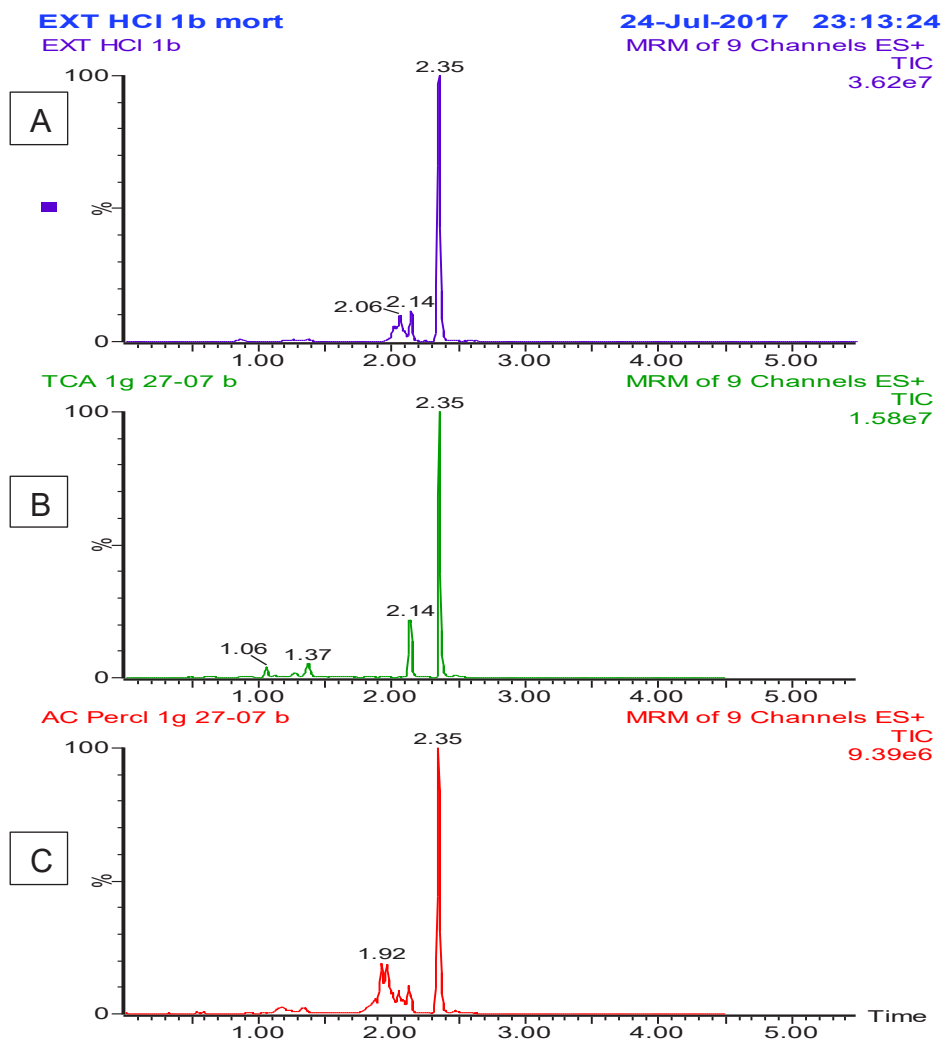
Os cromatogramas que mostram, separadamente, cada um dos íons produto da fragmentação das aminas biogênicas analisadas podem ser observados na figura 6. Nos cromatogramas à direita estão as transições “quanti”, utilizadas para a quantificação dos analitos, pois são os íons mais abundantes da fragmentação. À esquerda estão apresentadas as transições “quali”, utilizadas para confirmação dos compostos. Somente um íon produto foi determinado para a putrescina devido a apresentar a menor massa molecular entre as aminas avaliadas e, por isso, ser menos fragmentada.



**Figura 6** – Cromatogramas MRM dos íons produto utilizados para quantificação e confirmação das aminas biogênicas analisadas

### **Condições de extração**

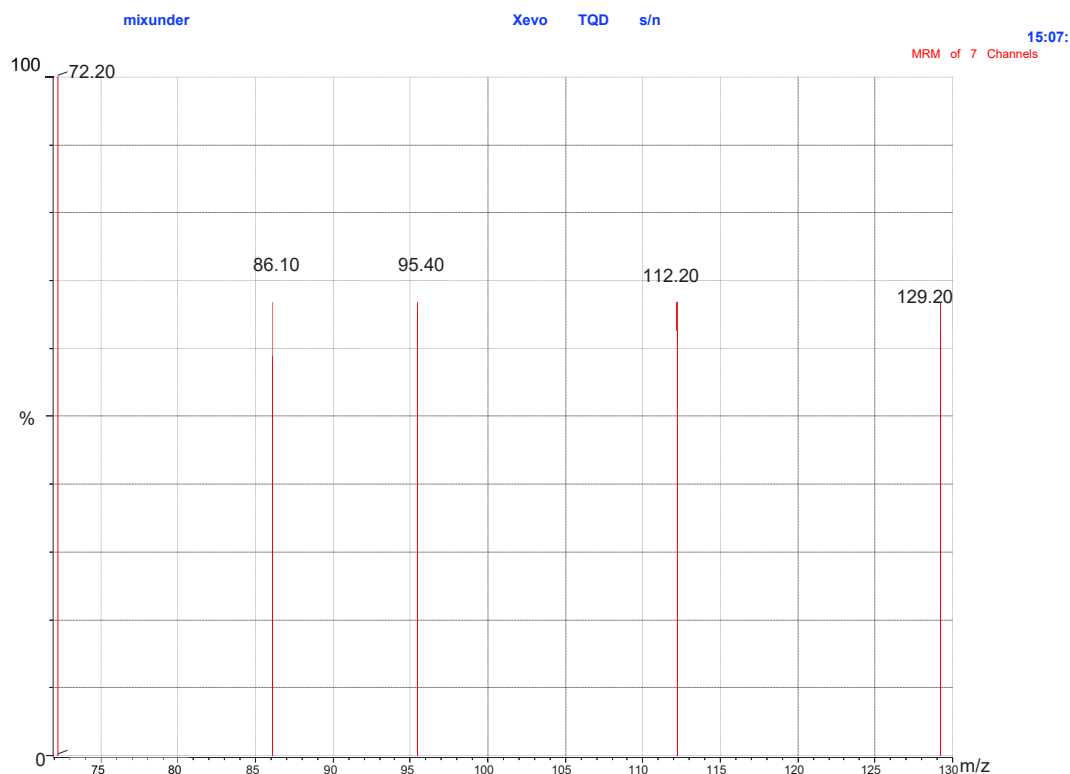
Através da comparação dos cromatogramas obtidos na extração das aminas biogênicas de amostras de mortadela com as três soluções ácidas testadas (figura 7), observou-se que o melhor resultado foi alcançado com o ácido tricloroacético a 5% por apresentar linha de base mais limpa e sem interferentes nos tempos de retenção dos analitos avaliados.



**Figura 7** – Cromatogramas de amostras extraídas com os ácidos testados: ácido clorídrico 0,6 M (A), ácido tricloroacético 5% (B) e ácido perclórico 0,1 M (C). Fases móveis água e ACN adicionadas de 0,1% de PFPA.

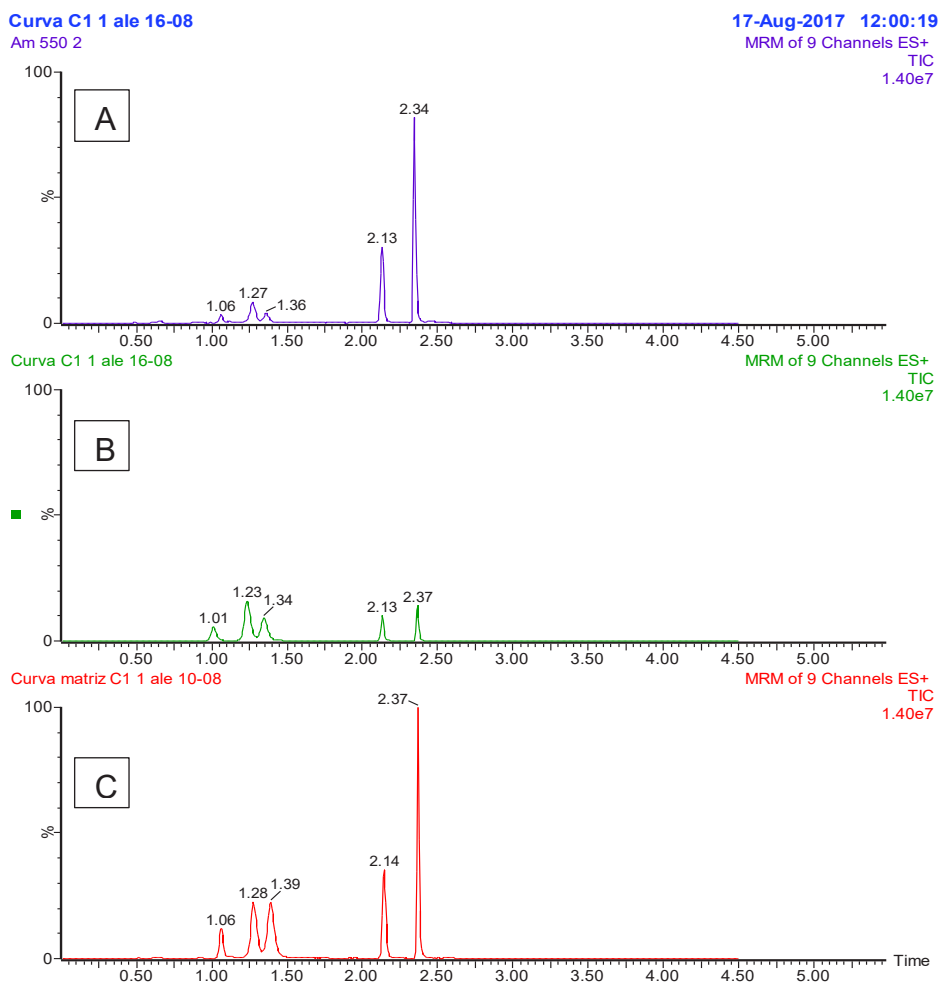
### **Validação do método para aminas biogênicas não derivatizadas**

Na comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras com os cromatogramas do padrão em solvente e da amostra fortificada, não foram observados compostos com picos coincidentes e nem picos de interferentes. Através do espectro de massas (Figura 8) foi possível confirmar a identidade dos compostos de cada pico demonstrando assim uma seletividade adequada.



**Figura 8** – Espectro de massas da mistura de padrões das aminas não derivatizadas.

O efeito matriz foi avaliado através de análise estatística, com aplicação do teste F e teste t, de acordo com o manual de qualidade analítica do MAPA (BRASIL, 2015a). Essa análise indicou que existe efeito matriz para putrescina, espermina e espermidina e não há efeito matriz para a cadaverina e a histamina. Sendo assim, a curva de calibração foi preparada em extrato de amostra. Na figura 9 são apresentados os cromatogramas de uma amostra de mortadela, de padrões em solvente e padrões em matriz.



**Figura 9** - Cromatogramas referentes a: amostra de mortadela (A), padrões em solvente (B) e padrões em matriz (C).

Como não há amostra “branca” disponível, as curvas foram feitas em extrato de amostras, que contêm concentrações variáveis para cada uma das 5 aminas biogênicas analisadas, e as áreas referentes à amostra que gerou o extrato foram descontadas das áreas de cada ponto da curva. A ausência de amostra “branca” também dificultou a determinação do limite de detecção através de cálculos, pois as concentrações das aminas nas amostras interferem nos valores obtidos.

A exatidão do método, avaliada através da recuperação, apresentou os valores listados na tabela 6, que podem ser considerados satisfatórios comparados à faixa recomendada no documento orientativo do INMETRO (2016) que é de 80% a 110%.

A precisão, estimada pelos valores dos coeficientes de variação (CV) das mesmas amostras fortificadas utilizadas para o cálculo da recuperação, também foi considerada satisfatória, pois ficaram entre 1,1 e 3,9 %, menores do que os critérios de aceitação da precisão apresentados no documento orientativo do INMETRO (2016), que é de 7,3 a 11%.

Os coeficientes de correlação linear (r) das curvas analítica apresentaram valores entre 0,993 e 0,998, valores superiores ao indicado pelo guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos - RE 899 de 29/05/2003 (BRASIL, 2003), que é de 0,99, e indicando uma linearidade adequada para as faixas de concentrações estudadas.

As faixas de linearidade e os limites de quantificação (LQ) variaram entre as amins biogênicas analisadas conforme descrito na tabela 6. O limite de detecção (LD) foi estabelecido em 0,04 mg kg<sup>-1</sup>.

**Tabela 6 – Resultados de validação do método para determinação de amins biogênicas em mortadelas com adição de padrão em três níveis (recuperação, repetitividade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)).**

<b>Amina biogênica</b>	Nível de adição de padrão (mg kg <sup>-1</sup> )	Recuperação (%) <sup>*</sup>	CV (%)	LD (mg kg <sup>-1</sup> )	Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )	Coefficiente de correlação (r)
Putrescina	0,2	100,9	3,9	0,04	0,02 a 2,0	0,993
	5,0	108,6	3,4			
	30,0	98,8	0,8			
Cadaverina	0,2	99,8	5,6	0,04	0,02 a 1,0	0,997
	5,0	100,9	1,4			
	30,0	98,2	0,4			
Histamina	0,2	107,1	1,8	0,04	0,02 a 2,5	0,996
	5,0	102,8	1,0			
	50,0	109,9	2,5			
Espermidina	2,0	114,1	2,2	0,04	0,25 a 7,0	0,997
	10,0	109,0	3,1			
	50,0	105,9	1,4			
Espermina	2,0	99,3	2,7	0,04	2,5 a 7,0	0,994
	10,0	96,7	4,4			
	50,0	106,1	0,8			

<sup>\*</sup>CV= coeficiente de variação

O limite de detecção e de quantificação apresentados na tabela 6 estão abaixo das concentrações usualmente encontradas em produtos cárneos e estão

de acordo com os valores encontrados na literatura (TRIKI *et al*, 2012; SIROCCHI *et al*, 2014; SAGRATINI *et al*, 2016)

A redução no tempo de execução da análise das cinco aminas biogênicas é de aproximadamente 60 %, quando se compara o método estabelecido nesse estudo, empregando UPLC e sem derivatização, que é de aproximadamente 8 horas, com um método tradicional onde é realizada a derivatização das aminas e separação em HPLC,

### ***Avaliação de mortadelas de baixo custo***

Com pode-se observar na Tabela 7, as concentrações de putrescina e cadaverina em todas as amostras foram inferiores a  $9,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , enquanto para histamina os valores atingiram  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ . Para espermidina os valores variaram entre  $6,5$  e  $47,9 \text{ mg kg}^{-1}$ , enquanto para espermina ficaram na faixa de  $29,1$  a  $235,1 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Os teores de histamina encontrados nas mortadelas foram muito inferiores aos limites estabelecidos pela legislação com relação ao risco à saúde, porém esses valores podem ser utilizados como parâmetros indicativos das condições de higiene das matérias primas e do processo de fabricação.

Não foram encontrados na literatura resultados de produtos cárneos similares aos analisados nesse trabalho, pois os produtos cárneos estáveis à temperatura ambiente geralmente são fermentados e os embutidos cozidos usualmente são armazenados a temperaturas de refrigeração. Mesmo assim, os resultados obtidos para as mortadelas foram comparáveis aos valores encontrados para grande parte dos produtos cárneos de boa qualidade, no que diz respeito às aminas biogênicas cadaverina, putrescina, histamina e espermidina. Já os valores de espermina encontrados para a maior parte das mortadelas foram consideravelmente altos quando comparados com dados disponíveis para carnes frescas e produtos cárneos processados. Uma das causas pode ser uma alta concentração de espermina nas carnes e miúdos usados como matérias primas desses produtos. De acordo com Giroto (2010) podem ser encontrados valores de até  $473$  e  $564 \text{ mg kg}^{-1}$  nas carnes frescas de bovino e suíno, respectivamente. Poderia ser considerado também que a maioria

das aminas biogênicas é estável em altas temperaturas e em meios ácidos, não sendo, dessa forma, destruídas durante o aquecimento, congelamento ou em outras etapas do processamento (SAGRATINI, 2013).

**Tabela 7. Teores de aminas biogênicas em mortadelas comerciais de baixo custo**

Mortadela	PUT mg kg <sup>-1</sup>	CAD mg kg <sup>-1</sup>	HIS mg kg <sup>-1</sup>	SPD mg kg <sup>-1</sup>	SPM mg kg <sup>-1</sup>
550 A lote 1	2,81 ± 0,07	4,41 ± 0,17	0,54 ± 0,01	15,50 ± 2,37	36,97 ± 9,53
737 A lote 2	1,94 ± 0,06	0,84 ± 0,08	< 0,2	23,10 ± 0,32	59,47 ± 1,12
549 B lote 1	1,05 ± 0,03	1,58 ± 0,04	0,61 ± 0,02	11,79 ± 0,39	35,35 ± 1,87
640 C lote1	<b>7,90 ± 0,65</b>	2,34 ± 0,18	<b>2,51 ± 0,11</b>	34,89 ± 1,08	213,04 ± 14,43
665 C lote 2	1,11 ± 0,03	0,97 ± 0,03	1,91 ± 0,01	<b>47,89 ± 0,67</b>	225,29 ± 2,61
579 C lote 3	4,93 ± 0,05	2,11 ± 0,04	1,83 ± 0,02	12,89 ± 0,16	109,05 ± 0,77
638 D lote 1	4,25 ± 0,37	2,01 ± 0,13	1,09 ± 0,02	34,48 ± 1,90	174,30 ± 12,25
578 E lote 1	<b>0,23 ± 0,03</b>	<b>0,37 ± 0,03</b>	0,63 ± 0,03	10,48 ± 0,52	75,50 ± 4,55
554 F lote 1	0,66 ± 0,05	2,52 ± 0,09	1,12 ± 0,05	22,25 ± 0,33	97,50 ± 5,63
555 G lote 1	1,13 ± 0,12	0,97 ± 0,01	0,81 ± 0,02	31,76 ± 1,04	131,79 ± 8,95
556 H lote 1	0,54 ± 0,07	1,32 ± 0,07	1,20 ± 0,01	32,17 ± 1,14	127,31 ± 1,55
582 I lote 1	1,79 ± 0,06	0,85 ± 0,02	1,76 ± 0,06	30,29 ± 0,88	151,99 ± 4,29
639 I lote 2	3,70 ± 0,06	1,76 ± 0,11	1,45 ± 0,10	32,70 ± 2,77	109,05 ± 0,77
663 J lote 1	0,26 ± 0,04	2,37 ± 0,06	1,21 ± 0,01	33,47 ± 0,58	130,88 ± 5,93
548 I lote 1	2,58 ± 0,98	<b>9,51 ± 1,81</b>	0,35 ± 0,02	14,01 ± 1,12	60,93 ± 4,39
584 K lote 1	1,17 ± 0,02	2,21 ± 0,07	1,68 ± 0,02	34,01 ± 1,05	189,03 ± 5,48
547 M lote 1	2,85 ± 0,14	0,70 ± 0,02	0,97 ± 0,10	23,76 ± 3,39	59,27 ± 8,69
583 M lote 2	2,53 ± 0,07	0,90 ± 0,02	2,26 ± 0,05	43,43 ± 1,50	226,93 ± 5,40
636 M lote 3	4,64 ± 0,04	1,79 ± 0,04	1,96 ± 0,00	41,75 ± 2,64	<b>235,11 ± 13,24</b>
637 N lote 1	4,41 ± 0,20	1,66 ± 0,14	1,63 ± 0,01	37,2 ± 1,27	187,84 ± 3,28
662 N lote 2	0,73 ± 0,09	1,23 ± 0,06	1,79 ± 0,08	41,34 ± 2,54	168,78 ± 8,89
679 O lote 1	7,44 ± 0,26	2,80 ± 0,08	2,03 ± 0,10	42,85 ± 1,92	233,76 ± 11,58
551 P lote 1	2,01 ± 0,13	0,49 ± 0,02	0,51 ± 0,05	<b>6,49 ± 0,22</b>	<b>29,12 ± 1,76</b>
<b>Médias</b>	2,64	1,99	1,36	28,63	133,40

Resultados expressos pela média e desvio padrão de triplicatas; letras maiúsculas representam as marcas. Valores extremos estão em negrito.

No produto cárneo embutido “bologna” apresentado, entre outros, no trabalho de Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero (2005) e nas mortadelas de frango analisadas no estudo realizado em 2002 por Silva & Gloria, as concentrações das aminas biogênicas, quando comparadas com as mortadelas avaliadas nesse estudo, foram, em média, iguais para putrescina, similares para e



cadaverina e histamina, e inferiores em cerca de 50% e 90%, respectivamente, para espermidina e espermina.

Os resultados dos parâmetros atividade de água, pH e as contagens de bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias, assim como de enterobactérias e bactérias lácticas, que podem ser relevantes na formação das aminas biogênicas, estão apresentados na tabela 8, abaixo.

**Tabela 8. Determinações de Aw, pH e contagem de bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias, enterobactérias e bactérias lácticas em mortadelas comerciais de baixo custo**

Mortadela	Aw	pH	Mesófilos aeróbios (log UFC g <sup>-1</sup> )	Mesófilos anaeróbios (log UFC g <sup>-1</sup> )	Bactérias lácticas (log UFC g <sup>-1</sup> )	Enterobactérias (log UFC g <sup>-1</sup> )
<b>550 A lote 1</b>	0,942 ± 0,001	5,80 ± 0,01	1,00	1,00	<1,00	<1,00
<b>737 A lote 2</b>	0,947 ± 0,001	6,12 ± 0,04	2,88	<b>1,30</b>	<1,00	<1,00
<b>549 B lote 1</b>	0,943 ± 0,001	5,81 ± 0,01	1,00	<1,00	<1,00	<1,00
<b>640 C lote1</b>	<b>0,974 ± 0,001</b>	6,08 ± 0,09	6,15	<b>5,91</b>	<1,00	<1,00
<b>665 C lote 2</b>	<b>0,976 ± 0,005</b>	6,26 ± 0,01	6,15	<b>5,90</b>	<1,00	<1,00
<b>579 C lote 3</b>	<b>0,969 ± 0,001</b>	6,06 ± 0,01	5,51	<b>8,08</b>	<1,00	<1,00
<b>638 D lote 1</b>	0,954 ± 0,001	6,08 ± 0,05	5,15	<1,00	<1,00	<1,00
<b>578 E lote 1</b>	0,948 ± 0,001	6,37 ± 0,01	1,30	<1,00	<1,00	<1,00
<b>554 F lote 1</b>	0,943 ± 0,001	5,78 ± 0,01	1,70	<1,00	<1,00	<1,00
<b>555 G lote 1</b>	0,956 ± 0,002	5,92 ± 0,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
<b>556 H lote 1</b>	0,954 ± 0,001	5,95 ± 0,01	1,48	<1,00	<1,00	<1,00
<b>582 I lote 1</b>	0,949 ± 0,001	6,13 ± 0,01	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
<b>639 I lote 2</b>	0,950 ± 0,001	6,10 ± 0,02	6,04	<b>3,85</b>	<1,00	<1,00
<b>548 J lote 1</b>	0,953 ± 0,001	5,96 ± 0,02	1,30	<1,00	<1,00	<1,00
<b>663 K lote 1</b>	0,949 ± 0,002	6,07 ± 0,01	1,48	<1,00	<1,00	<1,00
<b>584 L lote 1</b>	0,945 ± 0,001	6,07 ± 0,01	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
<b>547 M lote 1</b>	0,943 ± 0,001	5,86 ± 0,03	1,48	<1,00	<1,00	<1,00
<b>583 M lote 2</b>	0,947 ± 0,001	6,10 ± 0,01	1,90	<1,00	<1,00	<1,00
<b>636 M lote 3</b>	0,947 ± 0,001	6,10 ± 0,04	2,56	<1,00	<1,00	<1,00
<b>637 N lote 1</b>	0,951 ± 0,001	6,06 ± 0,04	5,49	<1,00	<1,00	<1,00
<b>662 N lote 2</b>	0,957 ± 0,001	6,20 ± 0,01	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
<b>679 O lote 1</b>	<b>0,972 ± 0,001</b>	6,13 ± 0,01	6,41	<b>6,71</b>	<1,00	<1,00
<b>551 P lote 1</b>	0,950 ± 0,001	5,82 ± 0,01	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00

Resultados de Aw e pH pela média e desvio padrão de triplicatas; letras maiúsculas representam as marcas.

Por se tratar de produtos cárneos cozidos, as contagens de bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias encontradas nas mortadelas indicam, respectivamente, a presença de esporos de *Bacillus sp.* e *Clostridium sp.*, nas matérias primas utilizadas.

Em seis amostras de mortadelas foram encontradas contagens de mesófilos anaeróbios superiores a 1,0 log UFC/g. Quatro delas apresentaram atividade de água acima de 0,955, que é o limite estabelecido pelo MAPA no Ofício-Circular nº 005/2015/CGI/DIPOA/SDA (BRASIL, 2015 (b)) como um dos requisitos que garantem a segurança das mortadelas conservadas em temperatura ambiente e devem ser cumpridos pelos fabricantes para registro desse tipo de produto. Nas outras duas amostras, que apresentaram atividade de água abaixo de 0,955, existe um indicativo de que a germinação de esporos presentes nas matérias primas foi parcialmente inibida. O que não ocorreu nas mortadelas com valores de atividade de água próximos a 0,97.

Em todas as amostras avaliadas foram encontradas contagens de enterobactérias e bactérias lácticas menores que 1,0 log UFC g<sup>-1</sup>, o que indica que o tratamento térmico que faz parte do processamento foi eficaz.

Não foi observada relação direta dos resultados das análises microbiológicas com as concentrações de aminas biogênicas encontradas nas mortadelas avaliadas. Existem dificuldades para que uma relação entre aminas biogênicas e contagens microbiológicas seja estabelecida seguramente, pois as enzimas aminoácido-descarboxilases possuem capacidade de apresentar diferentes composições dependendo das espécies bacterianas que as produzem e das condições em que essas bactérias se desenvolvem.

## 6. CONCLUSÕES

Uma metodologia para análise simultânea das aminas biogênicas putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina foi estabelecida e validada para análise de mortadelas. Os parâmetros de validação estudados demonstraram que o método é adequado para o uso pretendido.

A utilização da técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas sequencial (UPLC-ESI-MS/MS)

possibilitou detecção e quantificação satisfatórias das aminas biogênicas putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina nas amostras de mortadelas avaliadas.

A separação realizada por UPLC permitiu redução significativa do tempo de execução da análise e do volume de solventes orgânicos utilizados no processo de separação das aminas biogênicas, quando se compara com separações realizadas em HPLC. A detecção e quantificação dos analitos por MS/MS permitiram garantir seletividade e sensibilidade apropriadas, mesmo com a utilização de um procedimento simples de “clean up” e sem executar a etapa de derivatização das moléculas.

O método proposto é suficientemente sensível para quantificar os analitos estudados em níveis que possibilitam a correlação com as condições de higiene do processo de fabricação das mortadelas e/ou do estado de conservação, podendo inclusive fornecer dados para o cálculo de índices de qualidade como o “Biogenic Amines Index” (BAI) e também avaliar a segurança dessas mortadelas de baixo custo comercializadas em temperatura ambiente.

## 7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C., FERNANDES, J. O., & CUNHA, S. C. A novel dispersive liquid–liquid micro extraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 380-388, 2012.

ALVES, S. P., ALFAIA, C. M., ŠKRBIĆ, B. D., ŽIVANČEV, J. R., FERNANDES, M. J., BESSA, R. J., & FRAQUEZA, M. J. Screening chemical hazards of dry fermented sausages from distinct origins: Biogenic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy elements. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 59, p. 124-131, 2017.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 10, p. 341-346, 1995.

BIJI, K. B., RAVISHANKAR, C. N., VENKATESWARLU, R., MOHAN, C. O., & GOPAL, T. S. Biogenic amines in seafood: a review. **Journal of food science and technology**, v. 53, n. 5, p. 2210-2218, 2016.

BOMKE, S., SEIWERT, B., DUDEK, L., EFFKEMANN, S., & KARST, U. Determination of biogenic amines in food samples using derivatization followed by liquid chromatography/mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 393, n. 1, p. 247, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 04 de 31 de março de 2000. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de linguiça, de salsicha. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 05 abr. 2000, Seção 1, p. 6-10.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 25, de 02 de junho de 2011. Métodos analíticos oficiais físico-

químicos para controle de pescado e seus derivados. ANEXO. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 03 de jun 2011.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: MAPA/ACS, 2015 (a) 51 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Ofício-circular nº 005/2015/CGI/DIPOA/SDA.** Informações sobre registro do produto mortadela conservada em temperatura ambiente. Brasília, 27 de julho de 2015 (b).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.185, de 13 de maio de 1997. **Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e eviscerado).** Brasília: Ministério da Agricultura, 1997.

BUNKA, F., ZÁLESÁKOVÁ, L., FLASAROVÁ, R., PACHLOVÁ, V., BUDINSKÝ, P., & BUNKOVÁ, L. Biogenic amines content in selected commercial fermented products of animal origin. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2, n. 1, p. 209, 2012.

BUNKOVÁ, L., ADAMCOVÁ, G., HUDCOVÁ, K., VELICHOVÁ, H., PACHLOVÁ, V., LORENCOVÁ, E., & BUŇKA, F. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. **Food chemistry**, v. 141, n. 1, p. 548-551, 2013.

CARDOZO, M., LIMA, K. S., FRANCA, T. C., & LIMA, A. L. S. Aminas biogênicas: um problema de saúde pública. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 149-168, 2013.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CODEX. Joint FAO/WHO food standards programme, Codex alimentarius commission. Report of the thirty-third session of the Codex committee on fish and fishery products, CODEX, Geneva, 2014.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS (CE). Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**, L 338/1, 22 dez. 2005.

DADÁKOVÁ, E.; KRÍŽEK, M.; PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 365-370, 2009.

DANG, A.; PESEK, J. J.; MATYSKA, M. T. The use of aqueous normal phase chromatography as an analytical tool for food analysis: determination of histamine as a model system. **Food chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4226-4230, 2013.

DANIEL, D., DOS SANTOS, V. B., VIDAL, D. T. R., & DO LAGO, C. L. Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1416, p. 121-128, 2015.

DATAMARK. Mortadela 2012 a 2020. Disponível em: <http://www.datamark.com.br/>. Acessado em 09 de janeiro de 2017.

DEETAE, P., JAMNONG, P., ASSAVANIG, A., & LERTSIRI, S. Occurrence of biogenic amines in Thai soy sauces and soy bean pastes and their health concern. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 4, 2017.

DONG, H.; XIAO, K. Modified QuEChERS combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine seven biogenic amines in Chinese traditional condiment soy sauce. **Food Chemistry**, v. 229, p. 502-508, 2017.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **EFSA Journal** v. 9, n. 10 :2393. 93 p. 2011.

ERIM, F. B. Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 239-247, 2013.

European Commission DG-SANTE, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residue analysis in food and feed. No. SANTE/11945/2015, 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Fish and fishery products hazards and controls guidance**. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2011.

GIANOTTI, V., CHIUMINATTO, U., MAZZUCCO, E., GOSETTI, F., BOTTARO, M., FRASCAROLO, P., & GENNARO, M. C. A new hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of seven biogenic amines in cheese. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, n. 2, p. 296-300, 2008.

GIROTTO, J. M.; MASSON, M. L.; HARACEMIV, S. M. C. Aminas biogênicas em embutidos cárneos e em outros alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2010.

GOMES, M. B., DUARTE PIRES, B. A., PIMENTA FRACALANZZA, S. A., & MARIN, V. A. O risco das aminas biogênicas nos alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, 2014.

GUIDI, L. R., & GLORIA, M. B. A. Bioactive amines in soy sauce: Validation of method, occurrence and potential health effects. **Food chemistry**, v. 133, n. 2, p. 323-328, 2012.

HERNÁNDEZ-JOVER, T., IZQUIERDO-PULIDO, M., VECIANA-NOGUÉS, M. T., & VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amine sources in cooked cured shoulder

pork. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 3097-3101, 1996.

HUANG, X. W., ZOU, X. B., SHI, J. Y., GUO, Y., ZHAO, J. W., ZHANG, J., & HAO, L. Determination of pork spoilage by colorimetric gas sensor array based on natural pigments. **Foodchemistry**, v. 145, p. 549-554, 2014.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 5ª revisão, 2016.

International Organization for Standardization (ISO). 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. ISO 15214:1998, Geneva, Switzerland.

JIANG, L. R., XU, Z. W., ZENG, M., HUANG, J. Y., XU, L., FU, C. J., QUARANTINE, B. Determination of biogenic amines in aquatic products by modified QuEChERS method and liquid chromatography-mass spectrometry. **Science and Technology of Food Industry**, v. 22, p. 009, 2016.

KIM, M. K., MAH, J. H., & HWANG, H. J. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 87-95, 2009.

KORNACKI, J.L.; GURTLER, J.B.; STAWICK, B.A. Enterobacteriaceae, coliforms, and Escherichia coli as quality and safety indicators. In: SALFINGER, Y., and TORTORELLO, M.L.. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 5<sup>th</sup> ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 2015.

KOUHNAVARD, N.; FARHADI, M.; REZAEI, H. Z. Determining Biogenic Amines in Cooked Meat Products and Investigating Effect of Storage Time. **GMP Review**, v. 16, n. 4, 2015.

LEE, S., EOM, H. S., YOO, M., CHO, Y., & SHIN, D. Determination of biogenic amines in Cheonggukjang using ultra high pressure liquid



chromatography coupled with mass spectrometry. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 123-129, 2011.

MIETZ, J. L.; KARMAS, E. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 1, p. 155-158, 1977.

NAILA, A., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P., & MEERDINK, G. Control of biogenic amines in food - existing and emerging approaches. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, 2010.

ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1475-1486, 2007.

ÖNAL, A., TEKKELI, S. E. K., & ÖNAL, C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food chemistry**, v. 138, n. 1, p. 509-515, 2013.

Operator's Manual for series 4, 4TE, 4TEV, DUO e TEV DUO. Version September 16, 2014. Decagon Devices, Inc.

ORDÓÑEZ, J. L., TRONCOSO, A. M., GARCÍA-PARRILLA, M. D. C., & CALLEJÓN, R. M. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages—A review. **Analytica chimica acta**, v. 939, p. 10-25, 2016.

RAMOS, R. M., VALENTE, I. M., & RODRIGUES, J. A. Analysis of biogenic amines in wines by salting-out assisted liquid–liquid extraction and high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Talanta**, v. 124, p. 146-151, 2014.

REDRUELLO, B., LADERO, V., CUESTA, I., ÁLVAREZ-BUYLLA, J. R., MARTÍN, M. C., FERNÁNDEZ, M., & ALVAREZ, M. A. A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylene malonate as a derivatising agent. **Food chemistry**, v. 139, n. 1, p. 1029-1035, 2013.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE 899 de 29 de Maio de 2003. Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília DOU de**, v. 2, n. 06, 2003.

ROMERO-GONZÁLEZ, R., ALARCÓN-FLORES, M. I., VIDAL, J. L. M., & FRENICH, A. G. Simultaneous determination of four biogenic and three volatile amines in anchovy by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 21, p. 5324-5329, 2012.

RUIZ-CAPILLAS, C.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Biogenic amines in meat and meat products. **Critical Reviews in food Science and Nutrition**, v. 44, n. 7-8, p. 489-599, 2005.

SACCANI, G. et al. Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by suppressed ion chromatography-mass spectrometry using a cation-exchange column. **Journal of Chromatography A**, v. 1082, n. 1, p. 43-50, 2005.

SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. L. (2015). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, 2015.

SANTOS, L. F. L., MÁRSICO, E. T., LÁZARO, C. A., TEIXEIRA, R., DORO, L., & JÚNIOR, C. A. C. Evaluation of biogenic amines levels, and biochemical and microbiological characterization of Italian-type salami sold in Rio de Janeiro, Brazil. **Italian journal of food safety**, v. 4, n. 3, 2015.

SANTOS, M.H.S. Biogenic amines: their importance in foods. **International journal of food microbiology**, v. 29, n. 2-3, p. 213-231, 1996.

SENTELLAS, S.; NÚÑEZ, Ó.; SAURINA, J. Recent Advances in the Determination of Biogenic Amines in Food Samples by (U) HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 41, p. 7667-7678, 2016.

SILVA, C. M., & GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4±1 C and in chicken-based meat products. **Food chemistry**, v. 78, n. 2, p. 241-248, 2002.

SIROCCHI, V., CAPRIOLI, G., CECCHINI, C., COMAN, M. M., CRESCI, A., MAGGI, F., PAPA, F.; RICCIUTELLI, M.; VITTORI, S.; SAGRATINI, G. Biogenic amines as freshness index of meat wrapped in a new active packaging system formulated with essential oils of *Rosmarinus officinalis*. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 64, n. 8, p. 921-928, 2013.

SIROCCHI, V., CAPRIOLI, G., RICCIUTELLI, M., VITTORI, S., & SAGRATINI, G. Simultaneous determination of ten underivatized biogenic amines in meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, n. 9, p. 819-825, 2014.

SPIZZIRRI, U. G., RESTUCCIA, D., CURCIO, M., PARISI, O. I., IEMMA, F., & PICCI, N. Determination of biogenic amines in different cheese samples by LC with evaporative light scattering detector. **Journal of food composition and analysis**, v. 29, n. 1, p. 43-51, 2013.

STADNIK, J.; DOLATOWSKI, Z. J. Biogenic amines in meat and fermented meat products. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 9, n. 3, p. 251-263, 2010.

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

TODOROKI, K., ISHII, Y., MIYAUCHI, C., KITAGAWA, S., MIN, J. Z., INOUE, K., & TOYO'OKA, T. Simple and Sensitive Analysis of Histamine and Tyramine in Japanese Soy Sauces and Their Intermediates Using the Stable Isotope Dilution HILIC-MS/MS Method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 26, p. 6206-6211, 2014.

TRIKI, M., JIMÉNEZ-COLMENERO, F., HERRERO, A. M., & RUIZ-CAPILLAS, C. Optimization of a chromatographic procedure for determining

biogenic amine concentrations in meat and meat products employing a cation-exchange column with a post-column system. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1066-1073, 2012.

VESSECCHI, Ricardo et al. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, 2011.

VINCI, G., RESTUCCIA, D., & ANTIOCHIA, R. Determination of biogenic amines in wines by HPLC-UV and LC-ESI-MS: A comparative study. **La Chimica e l'Industria**, v. 93, n. 7, p. 128-135, 2011.

YOSHIDA, T., HAMADA, H., MURAKAWA, H., YOSHIMOTO, H., TOBINO, T., & TODA, K. Determination of histamine in seafood by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 28, n. 2, p. 179, 2012.