



Maria do Rosário Machado Lopes

Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação de aminas biogénicas em licores

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de
Mestre em Controlo de Qualidade na Especialidade de Água
e Alimentos

Trabalho realizado sob a orientação da Doutora Sara Cristina da Silva Cunha e
coorientação do Professor Doutor José de Oliveira Fernandes

Porto
Outubro 2014

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Agradecimentos

A Deus, pela presença constante na minha vida.

À minha orientadora, Doutora Sara Cunha, pela oportunidade, disponibilidade, transmissão de conhecimentos, por toda a atenção, confiança e carinho demonstrados ao longo de todo o trabalho, e pelas palavras de ânimo e estímulo.

Ao Professor Doutor José Fernandes pelos conselhos sábios, pela confiança e disponibilidade.

Aos meus pais e à minha irmã por toda a ajuda, compreensão, confiança e apoio ao longo de todos estes anos.

Ao Tiago pelo apoio incansável, por todas as palavras de incentivo, por nunca deixar de acreditar em mim e por estar sempre a meu lado.

A todos os meus colegas de mestrado, pela troca de carinho e apoio e por estarem sempre presentes e disponíveis para ajudar.

A todos as pessoas que trabalham no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia, por toda a ajuda durante a execução do trabalho experimental.

A todos o meu sincero obrigada!

Trabalhos desenvolvidos no âmbito desta dissertação

Comunicações:

1. M. R. Lopes, J. O. Fernandes, S. C. Cunha. Quantification of Biogenic Amines in Liquors by a DLLME based method. *Poster*, 7º Encontro de Investigação Jovem da U. Porto, Porto, Fevereiro, 2014.
2. Rosário Lopes, José Fernandes, Sara Cunha. Development of a DLLME extraction procedure for the GC-MS determination of eighteen biogenic amines in liquors. *Poster*, 12º Encontro de Química dos Alimentos, Lisboa, Setembro, 2014.

Resumo

O licor é uma bebida espirituosa obtida pela mistura de álcool, água, açúcar e substâncias aromatizadas, que pode ser produzida a nível industrial e caseiro. Em Portugal existem quatro licores com a designação IG (indicação geográfica). São eles: o Licor de Singeverga, a Ginjinha Portuguesa, o Anis Português e a Poncha da Madeira.

As aminas biogénicas são bases azotadas de baixo peso molecular com estrutura alifática, aromática ou heterocíclica. A sua presença em alimentos constitui um ponto crítico de segurança alimentar dada a sua implicação em fenómenos de intoxicações alimentares, com especial destaque para a histamina.

O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento e validação de um método simples, confiável e sensível de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) capaz de possibilitar a determinação simultânea de 18 aminas biogénicas alifáticas, heterocíclicas e aromáticas em amostras de licores feitos e comercializados em Portugal, à base de café, ervas, frutas, leite e mel. O método baseia-se num procedimento avançado de microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) que permite uma extração e derivatização simultânea de todas as aminas em estudo de um modo simples e rápido. Rapidamente, a 5 mL de amostra adicionou-se uma mistura de acetonitrilo (solvente de dispersão, 1 mL), tolueno (solvente de extração, 325 µL), e cloroformato de isobutilo (reagente de derivatização, 25 µL). Depois de uma breve agitação e um passo de centrifugação, 1 µL da fase toluénica foi utilizada para analisar por GC-MS das aminas na forma de derivados de cloroformato.

O método apresentou boa linearidade (coeficiente de correlação > 0.999), boa repetibilidade intra-dia e inter-dia (coeficiente de variação máximo de 11%) e boas recuperações (79-108%) para todas as aminas em estudo. O limite de deteção determinado foi 0,004 mg/L. O limite de quantificação foi de 0,01 mg/L.

O método foi usado na análise de 27 amostras de licores (comerciais e caseiros), tendo os níveis obtidos seguido genericamente a seguinte ordem: dimetilamina > morfolina > putrescina > metilamina > histamina > etilamina. As aminas com mais frequência nas amostras analisadas foram a morfolina, a cadaverina, a etilamina, a dimetilamina, a dietilamina e a tiramina.

A análise estatística dos resultados obtidos permitiu verificar a existência de diferenças significativas entre os diferentes modos de produção e entre os diferentes tipos de licores analisados.

Palavras-chave: Licor, aminas biogénicas, DLLME, cloroformato de isobutilo, GC-MS.

Abstract

Liqueurs are spirit drinks produced by the mixture of alcohol, water, sugar and flavored substances that can be produced industrial and homemade level. In Portugal there are four liqueurs with the designation GI (geographical indication). They are: “Licor de Singeverga”, “Ginjinha Portuguesa”, “Anis Português” and “Poncha da Madeira”.

Biogenic amines are nitrogen bases with low molecular weight aliphatic, aromatic or heterocyclic structure. Their presence in food is a critical point of food security given its implication in phenomena of food poisoning, with special reference to histamine.

The objective of this work was the development and validation of a simple, reliable and sensitive method of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) capable of enabling the simultaneous determination of 18 aliphatic, heterocyclic and aromatic biogenic amines in samples of liqueurs made and marketed in Portugal, based on coffee, herbs, fruits, milk and honey. The method is based on an advanced procedure dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) which allows simultaneous extraction and derivatization of all the amines in the study in a simple and fast way. Quickly, 5 mL of sample was added to an acetonitrile (solvent dispersion 1 mL), toluene (solvent extraction, 325 μ L) and isobutyl chloroformate (derivatization reagent, 25 μ L). After brief shaking and centrifugation step, 1 μ L of toluene phase was used for GC-MS analysis amines as chloroformate derived.

It was showed good linearity (correlation coefficient > 0.999), good repeatability intra-day and inter-day (maximum coefficient of variation of 11%) and good recoveries (79-108%) for all the amines studied. The limit of detection was given 0.004 mg/L. The limit of quantification was 0.01 mg/L.

The method used in the analysis of 27 samples of liquors (commercial and homemade), with levels obtained generally followed the following order: dimethylamine > morpholine > putrescine > methylamine > histamine > ethylamine. The amines most often in the samples were morpholine, cadaverine, ethylamine, dimethylamine, diethylamine and tyramine.

The statistical analysis of the results has shown the existence of significant differences between the different modes of production and between different types of liquors analyzed.

Key-words: Liquor, biogenic amines, DLLME, isobutyl chloroformate, GC-MS.

Índice Geral

Introdução Geral.....	1
PARTE TEÓRICA	5
Objetivos da Parte Teórica	7
Capítulo I – Licor: uma bebida espirituosa	9
1.1 Caracterização do licor.....	11
1.2 História	11
1.3 Matérias-primas.....	12
1.3.1 Álcool	12
1.3.2 Açúcar	12
1.3.3 Água	13
1.3.4 Matérias vegetais	13
1.4 Produção de licores.....	13
1.4.1 Preparação das matérias-primas	14
1.4.2 Obtenção do extrato alcoólico	14
1.4.3 Mistura da água com o açúcar	15
1.4.4 Adição da mistura água-açúcar ao extrato alcoólico	15
1.4.5 Filtração e clarificação.....	15
1.4.6 Conservação e armazenamento	16
1.5 Classificação dos licores	17
1.6 Fabrico artesanal.....	18
1.7 Licores portugueses com indicação geográfica	18
1.7.1 Licor de Singeverga.....	19
1.7.2 Ginjinha Portuguesa	20
1.7.3 Anis Português	20
1.7.4 Poncha da Madeira	20
1.8 Licores com reconhecimento mundial	21
Capítulo II – Aminas Biogénicas.....	23
2.1 Origem e classificação	25
2.2 Microrganismos produtores de aminas biogénicas	29
2.3 Função e importância.....	30
2.4 Toxicidade	30
2.5 Presença de AB em bebidas alcoólicas	31
2.5.1 Vinho	31
2.5.2 Cerveja	33
2.5.3 Bebidas espirituosas	33
2.6 Níveis máximos legislados	34
2.7 Métodos analíticos.....	34
2.8 Extração	35
2.8.1 Métodos convencionais	35
2.8.2 Microextração	36
2.8.2.1 Microextração em fase sólida (SPME).....	37
2.8.2.2 Microextração em fase líquida (LPME).....	38
2.8.2.3 Microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME)	38

2.9	Derivatização de aminas	41
2.9.1	Reagentes de derivatização para Cromatografia Líquida	42
2.9.2	Reações de derivatização para Cromatografia Gasosa	43
2.9.2.1	Acilação	43
2.9.2.2	Sililação	44
2.9.2.3	Formação de base de Schiff	45
2.9.2.4	Formação de carbamatos	45
PARTE EXPERIMENTAL		47
Objetivos da Parte Experimental		49
Capítulo III – Delineamento Experimental		51
3.1	Materiais	53
3.1.1	Amostragem	53
3.1.2	Reagentes	54
3.1.2.1	Padrões de aminas	54
3.1.2.2	Padrões internos	54
3.1.2.3	Solventes	55
3.1.2.4	Gases	55
3.1.3	Equipamentos	55
3.1.3.1	Sistema GC-MS	55
3.1.3.2	Outros equipamentos	56
3.1.3.3	Consumíveis	56
3.2	Procedimento analítico	57
3.2.1	Processo de extração e derivatização	57
3.2.2	Condições cromatográficas	57
3.3	Identificação e quantificação	60
3.4	Tratamento estatístico	61
Capítulo IV – Resultados e Discussão		63
4.1	Validação do método analítico	65
4.1.1	Linearidade	65
4.1.2	Repetibilidade intra-dia e inter-dia	66
4.1.3	Ensaio de recuperação	67
4.1.4	Limite de detecção e limite de quantificação	70
4.2	Perfil de aminas biogénicas em amostras de licores	70
4.2.1	Resultados	70
4.2.2	Discussão dos resultados	79
4.2.2.1	Análise individual das aminas	79
4.2.2.2	Análise por modos de produção	84
4.2.2.3	Análise por tipos de licores	85
Conclusões		93
Referências Bibliográficas		97

Índice de figuras

Figura 1.1. Esquema geral de produção de licores (Adaptado de Teixeira <i>et al.</i> , 2011) ...	14
Figura 1.2. Licor de Singeverga (imagem de cima) e respetivo rótulo (imagem de baixo) (Mosteiro de Singeverga, 2014).....	19
Figura 1.3. Rótulo de um exemplar de Poncha da Madeira (Adaptado de Garrafeira Nacional, 2014).....	21
Figura 1.4. Licores com reconhecimento mundial (Adaptado de Garrafeira Nacional, 2014)	21
Figura 2.1. Estrutura química da histamina e das amins aromáticas tiramina e 2-feniletilamina (Adaptado de Önal, 2007).....	26
Figura 2.2. Estrutura química das diaminas e das poliaminas naturais (Adaptado de Önal, 2007).....	27
Figura 2.3. Estrutura química das amins voláteis - monoaminas alifáticas e amins acíclicas (Adaptado de Önal, 2007).....	28
Figura 2.4. Procedimento de microextração dispersiva líquido-líquido (Adaptado de Zgoła-Grzeškowiak e Grzeškowiak, 2011).....	39
Figura 3.1. Gráfico da rampa de temperatura de análise por GC-MS	58
Figura 4.1. Cromatograma representativo do perfil de amins biogénicas de uma amostra de licor de fabrico caseiro e à base de fruta (H13) (1- metil[² H ₃]amina; 2- metilamina; 3- dimetilamina; 4- etil[² H ₅]amina; 5- etilamina; 6- dietilamina; 7- isobutilamina; 8- 2,2,3,3,4,4,5,5-[² H ₈]pirrolidina; 9- pirrolidina; 10- isoamilamina; 11- morfolina; 12- amilamina; 13- anfetamina (PI); 14- 1,3-diaminopropano; 15- [² H ₈]putrescina; 16- putrescina; 17- cadaverina); análise por GC-MS	71
Figura 4.2. Frequência das 18 amins biogénicas analisadas num total de 27 amostras de licores.....	79
Figura 4.3. Frequência em percentagem (%) das 18 amins biogénicas analisadas em amostras de licores, agrupadas de acordo com a sua estrutura química.....	80
Figura 4.4. Valores máximos, mínimos e médias (▲) da concentração (mg/L) das 18 amins biogénicas analisadas em amostras de licores.....	81
Figura 4.5. Concentração média total e desvio-padrão (mg/L) de amins biogénicas, agrupadas de acordo com a sua estrutura química, em amostras de licores com diferentes modos de produção (comercial e caseiro).....	84
Figura 4.6. Concentração média total e desvio-padrão (mg/L) de amins biogénicas, agrupadas de acordo com a sua estrutura química, em diferentes tipos de amostras de licores (tipo 1- café, tipo 2- ervas, tipo 3- frutas, tipo 4- leite e tipo 5- mel)	86

Índice de Tabelas

Tabela 3.1. Classificação dos licores quanto ao tipo: à base de café, à base de ervas, à base de frutas, à base de leite e à base de mel, principais matérias-primas descritas no rótulo, modo de produção e teor alcoólico das amostras comerciais.	53
Tabela 3.2. Condições para a quantificação de amins biogénicas por GC-MS em modo de monitorização seletiva de iões (SIM).	59
Tabela 3.3. Padrões internos usados na quantificação das diferentes amins biogénicas.	60
Tabela 4.1. Equação da reta de calibração obtida pela análise de 9 soluções padrão de cada uma das amins estudadas e respetivo coeficiente de correlação (r) (padrões internos a 20 mg/L).....	66
Tabela 4.2. Resultados da repetibilidade intra-dia e inter-dia do método: média e desvio-padrão (SD) (mg/L), e coeficiente de variação expresso em % de seis réplicas da amostra H22	67
Tabela 4.3. Resultados dos ensaios de recuperação do método e do coeficiente de variação dos triplicados analisados para cada nível de adição (0,025; 0,05 e 0,25 mg/L) numa amostra de licor comercial (C5), ambos expressos em percentagem (%)	68
Tabela 4.4. Teor de amins biogénicas (mg/L) primárias (metilamina, etilamina, isopropilamina, isobutilamina, 2-metilbutilamina, isoamilamina e amilamina) nas amostras de licores analisados com diferentes modos de produção e diferentes tipos de matérias-primas utilizadas no seu fabrico (média e desvio-padrão de três leituras da mesma amostra); análise por GC-MS	72
Tabela 4.5. Teor de amins biogénicas (mg/L) secundárias (dimetilamina e dietilamina) nas amostras de licores analisados com diferentes modos de produção e diferentes tipos de matérias-primas utilizadas no seu fabrico (média e desvio-padrão de três leituras da mesma amostra); análise por GC-MS	74
Tabela 4.6. Teor de amins biogénicas (mg/L) diaminas (1,3-diaminopropano, putrescina e cadaverina) nas amostras de licores analisados com diferentes modos de produção e diferentes tipos de matérias-primas utilizadas no seu fabrico (média e desvio-padrão de três leituras da mesma amostra); análise por GC-MS	75
Tabela 4.7. Teor de amins biogénicas (mg/L) N-heterocíclicas (pirrolidina, morfolina, piperidina e histamina) nas amostras de licores analisados com diferentes modos de produção e diferentes tipos de matérias-primas utilizadas no seu fabrico (média e desvio-padrão de três leituras da mesma amostra); análise por GC-MS.....	76
Tabela 4.8. Teor de amins biogénicas (mg/L) aromáticas (2-feniletilamina e tiramina) nas amostras de licores analisados com diferentes modos de produção e diferentes tipos de matérias-primas utilizadas no seu fabrico (média e desvio-padrão de três leituras da mesma amostra); análise por GC-MS	78
Tabela 4.9. Valores medianos, entre parênteses mínimos e máximos (mg/L) de cada uma das 18 amins analisadas em diferentes modos de produção (comercial e caseiro).....	85
Tabela 4.10. Valores medianos, entre parênteses mínimo e máximo (mg/L) de cada uma das 18 amins analisadas em diferentes tipos de licores (à base de café, à base de ervas, à base de frutas, à base de leite e à base de mel)	90

Abreviaturas

AB – Aminas biogénicas
BAL – Bactérias do ácido láctico
BEHPA – Hidrogenofosfato de bis(2-etil-hexilo)
BSA – N,O-Bis-TMS-acetamida
BSTFA – N,O-Bis-TMS-trifluoroacetamida
DLLME – Microextração dispersiva líquido-líquido
FDA – “Food and Drug Administration”
EFSA – “European Food Safety Authority” (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar)
GC – Cromatografia gasosa
GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
HDMS – Hexametildissilazano
HPLC – Cromatografia líquida de elevada eficiência
IBCF – Cloroformato de isobutilo
IG – Indicação Geográfica
IGP – Indicação Geográfica Protegida
LC – Cromatografia líquida
LLE – Extração líquido-líquido
LPME – Microextração em fase líquida
LPME-HF – Microextração em fase líquida com fibra oca
MSTFA – N-Metil-N-TMS-trifluoroacetamida
OIV – “Organisation Internationale de la Vigne et du Vin” (Organização Internacional da Vinha e do Vinho)
OPA - Ortoftaldialdeído
PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
PTFE - Politetrafluoroetileno
PI – Padrão interno
PFB – Pentafluorobenzaldeído
rpm – Rotações por minuto
SIM – Monitorização seletiva de iões
SPE – Extração em fase sólida
SPME – Microextração em fase sólida
t-BDMS – *t*-butildimetilsilil
TMCS – Trimetilclorosilano
TMS – Trimetilsilil
TMSIM – Trimetilsililimidazol

Introdução Geral

Os licores correspondem a produtos tradicionais obtidos pela mistura de álcool, água, açúcar e substâncias aromatizantes. Devido aos teores elevados de álcool, é possível preparar um licor sem a utilização de conservantes químicos, garantindo assim a elaboração de um produto natural, estável e seguro. O segredo do sucesso desta bebida está no desenvolvimento de formulações que conjuguem harmoniosamente o aroma e o sabor das frutas, das ervas, e das sementes utilizadas com o álcool e o açúcar, proporcionando um produto de grande aceitação pelos potenciais consumidores. A origem remota deste tipo de bebida é atribuída a poções caseiras e a xaropes de ervas e de frutas preparados por velhas senhoras do povo, seguindo antigas receitas familiares, que passavam de geração a geração, com o objetivo de curar pequenas maleitas. Essas preparações resultavam em bebidas adocicadas, muito saborosas e, por vezes, coloridas que, se não curavam os doentes, pelo menos os reconfortavam e os deixavam felizes por uns momentos (Teixeira *et al.*, 2011).

Os licores podem ser produzidos de diversas formas, de início artesanais transmitidas de geração em geração, até se chegar à produção em escala industrial. Apesar dos avanços tecnológicos verificados, o processo industrial de fabrico de licores é em tudo semelhante ao utilizado antigamente (Teixeira *et al.*, 2011).

A produção baseia-se genericamente na maceração em álcool das frutas e outros produtos vegetais usados, ou na destilação de macerados aromáticos à base de frutas. A qualidade do produto final depende fundamentalmente das matérias-primas empregadas, sendo necessário, porém, garantir a estabilidade física, química e microbiológica do produto final (Gutiérrez *et al.*, 1995).

O licor não é um produto fermentado, podendo no entanto, conter na sua constituição matérias-primas de menor qualidade, sem uma correta higienização e desinfecção que vão determinar a presença de amins biogénicas no produto final. Além disso, o álcool utilizado na produção de licores pode ser de origem fermentativa, ou obtido por destilação após fermentação alcoólica de um ou vários produtos agrícolas por diversos microrganismos com capacidade de produção de amins biogénicas, as quais são transmitidas para o licor durante o seu processo de fabrico.

As amins biogénicas são bases orgânicas azotadas de baixo peso molecular, com estrutura alifática (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromática (tiramina, feniletilamina) ou heterocíclica (histamina, triptamina) (Marques *et al.*, 2008). A sua presença em alimentos constitui um ponto crítico de segurança e qualidade alimentar dada a sua implicação em fenómenos de intoxicações alimentares.

Em geral, a presença de amins biogénicas pode ser esperada em quase todos os produtos alimentares que contêm proteínas e aminoácidos, e que são submetidos a condições que permitem a ocorrência de atividade microbiana. No entanto, o teor total das

diferentes amins depende fortemente da natureza do produto, dos microrganismos presentes e das condições de produção e de armazenamento (Bover-Cid *et al.*, 2014). Desta forma, é necessário avaliar a presença e o rendimento total das amins biogénicas na dieta humana pois são indicadores da qualidade, higiene e segurança dos alimentos, uma vez que a presença de amins biogénicas é indicador da utilização de matérias-primas de fraca qualidade bem como da presença de contaminações devido a deficientes condições de processamento e armazenamento de alimentos.

Organização da dissertação

A presente dissertação encontra-se dividida em duas partes, Parte Teórica e Parte Experimental. A Parte teórica está subdividida em dois capítulos, em que no Capítulo I é apresentada uma revisão bibliográfica sobre os Licores e no Capítulo II sobre Amins Biogénicas.

A Parte Experimental está igualmente dividida em dois capítulos, nos quais está contida toda a parte experimental do trabalho desenvolvido, desde o delineamento experimental até à apresentação e discussão dos resultados obtidos.

PARTE TEÓRICA

Objetivos da Parte Teórica

A Parte Teórica teve como principal objetivo a revisão bibliográfica sobre os licores e sobre as amins biogénicas:

- *Revisão bibliográfica sobre licores* – o objetivo deste capítulo consistiu na caracterização do licor como uma bebida espirituosa, com realce para i) os aspetos históricos associados; ii) as matérias-primas utilizadas na sua produção; iii) as principais etapas de fabrico, desde a preparação das matérias-primas até ao envelhecimento e conservação do produto final; e iv) a classificação dos licores quanto à principal matéria vegetal utilizada. Finalmente são apresentados os licores portugueses com indicação geográfica, sendo feita uma breve referência às matérias-primas usadas e ao processo de fabrico, bem como ao seu teor alcoométrico. É igualmente feita uma breve referência aos licores com reconhecimento mundial.
- *Revisão bibliográfica sobre amins biogénicas* – esta revisão começa pela definição e classificação das amins biogénicas, sendo feita referência à sua função e importância para os organismos vivos, aos microrganismos envolvidos na sua produção em alimentos e bebidas, à sua potencial toxicidade e à sua presença em bebidas alcoólicas fermentadas como vinho, cerveja e bebidas espirituosas. A segunda parte revisou as metodologias analíticas usadas para a deteção e quantificação de amins biogénicas em alimentos, com incidência nos processos de extração usados e nos processos de derivatização indispensáveis para a sua análise pelas técnicas cromatográficas de HPLC e GC.

1. Licor: uma bebida espirituosa

1.1 Caracterização do licor

1.2 História

1.3 Matérias-primas

1.3.1 Álcool

1.3.2 Açúcar

1.3.3 Água

1.3.4 Matérias vegetais

1.4 Produção de licores

1.4.1 Preparação das matérias-primas

1.4.2 Obtenção do extrato alcoólico

1.4.3 Mistura da água com o açúcar

1.4.4 Adição da mistura água-açúcar ao extrato alcoólico

1.4.5 Filtração e clarificação

1.4.6 Conservação e armazenamento

1.5 Classificação dos licores

1.6 Fabrico artesanal

1.7 Licores portugueses com indicação geográfica

1.7.1 Licor de Singeverga

1.7.2 Ginjinha Portuguesa

1.7.3 Anis Português

1.7.4 Poncha da Madeira

1.8 Licores com reconhecimento mundial

1.1 Caracterização do licor

Licores são um grupo de bebidas espirituosas muito importante no mercado mundial, com um elevado consumo global, que apresenta uma gama extremamente ampla de marcas e de produtos tradicionais de composição especial (Christoph e Bauer-Christoph, 2007).

O termo “licor” vem do latim *liquifacere*, que significa liquefazer ou dissolver. Pode definir-se como uma bebida alcoólica obtida pela mistura de álcool, água, açúcar e substâncias aromáticas tais como, extratos de ervas, frutas, especiarias ou essências industriais (Marqués *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 2011). Servido em pequenas taças, além de muito saboroso, o licor tem propriedades digestivas, estimulantes e fortificantes.

Deve possuir um teor mínimo de açúcar, expresso em açúcar invertido, de 70 g/L caso se trate de um licor de cereja, cujo álcool etílico consista exclusivamente em aguardente de cereja. Por outro lado, licor de genciana ou similar, elaborado exclusivamente com genciana ou plantas similares como única substância aromatizante, deve conter um teor mínimo de açúcar de 80 g/L, expresso em açúcar invertido. Os restantes licores devem conter no mínimo 100 g/L, expresso em açúcar invertido. O título alcoométrico volúmico mínimo dos licores é de 15% (Regulamento (CE) nº110/2008).

1.2 História

Poção de amor para conquistar eternamente o ser amado, o licor tem uma história envolta em lendas de amor, de bruxas e de magos. Conta uma lenda que uma jovem desesperada de amor queria manter junto de si o seu amado. Após tentar, inutilmente, todos os artifícios, preparou uma mistura de ervas e frutas, extraindo desta uma bebida adocicada de sabor delicioso. Se conseguiu conquistar o seu amado ninguém sabe no entanto, deixou à posteridade uma bebida deliciosa (Santos e Ribeiro, 1991).

Outra versão sobre a origem do licor deve-se a bruxas que, sob a aparência de belas jovens, preparavam com frutas e ervas uma poção com o poder de unir para sempre um casal de amantes. No entanto, a versão mais plausível da origem do licor é que este nasceu nas poções caseiras e xaropes de ervas e frutas para curar tosses e outras enfermidades, elaboradas por mulheres do povo, de acordo com receitas familiares antigas (Santos e Ribeiro, 1991).

No início do século X os Árabes descobriram o ingrediente que faltava, ao desenvolver o processo de obtenção de álcool através da destilação de frutas. Verificaram ainda que a substância obtida além de possuir propriedades antissépticas poderia ter muitas outras finalidades. A partir de então, os alquimistas árabes e europeus passaram a utilizar álcool nos medicamentos (Santos e Ribeiro, 1991).

O licor, tal como o conhecemos hoje, só foi exequível após o alquimista catalão Arnaud Villeneuve, em 1250, ter conseguido extrair os princípios aromáticos das ervas após

maceração em álcool puro. Com esta descoberta, as técnicas de produção de licores foram aprimoradas, garantindo um produto final de elevada qualidade (Santos e Ribeiro, 1991; Teixeira *et al.*, 2011).

Aos monges devemos a criação de maravilhosos licores, cujas fórmulas são até hoje segredos “fechados” entre as paredes dos mosteiros (Santos e Ribeiro, 1991). São exemplos o licor de Benedictine D.O.M., o licor Chartreuse, e o licor de Singeverga, este último de origem portuguesa.

1.3 Matérias-primas

Na elaboração de licores, a qualidade do produto final depende principalmente da natureza das matérias-primas e da sua adequada combinação. Deste modo, o segredo da qualidade de um licor está na combinação perfeita do álcool com ervas aromáticas, frutas e açúcar, de forma a resultar um produto com grande harmonia entre cor, aroma e sabor (Santos e Ribeiro, 1991). Além disso, a adoção de boas práticas de fabrico durante o seu processamento permite igualmente a obtenção de um produto com qualidade (Teixeira *et al.*, 2011).

Na preparação dos licores só podem ser utilizados as substâncias e preparados aromatizantes naturais definidos no artigo 1º, nº 2, alínea b), subalínea i), e alínea c), da Directiva 88/388/CEE, e as substâncias e preparados aromatizantes idênticos aos naturais definidos no artigo 1º, nº 2, alínea b), subalínea ii), dessa directiva.

1.3.1 Álcool

O álcool é a matéria-prima principal do licor, estando a qualidade deste diretamente dependente da qualidade do álcool utilizado. O álcool permite a intensificação dos aromas e sabores vegetais do licor, que constituem a sua verdadeira identidade.

O álcool utilizado deve ser álcool etílico de origem agrícola ou obtido por destilação de bebidas fermentadas, sendo comum o uso de bebidas destiladas como conhaque, whisky, aguardente, vodka, que naturalmente conferem características especiais ao produto final (Regulamento (CE) nº110/2008). É também muito comum a utilização de álcool de cereais, refinado e sem cheiro, geralmente destilado de milho, batata ou arroz. A aguardente, muito utilizada no fabrico caseiro, não é apropriada na elaboração de licores finos, uma vez que transmite à bebida o seu aroma e sabor característicos (Santos e Ribeiro, 1991).

1.3.2 Açúcar

O açúcar é um componente fundamental na qualidade do licor. O açúcar utilizado no fabrico dos licores deve ser refinado, totalmente isento de impurezas, clarificado, descolorado, sem aromas e sabores estranhos. Deve dissolver-se completamente em

água, não deve deixar resíduos e a solução formada deve ser neutra (Santos e Ribeiro, 1991).

Em alguns licores são utilizados outros adoçantes em adição ou substituição do açúcar. Entre estes produtos, o mel é um dos mais utilizados para conferir sabor e aroma especial à bebida. Os critérios utilizados na escolha do mel são a pureza e o aroma pouco intenso. Pelo seu sabor agradável, cor clara e aroma leve, o mel de flor de laranjeira é um dos mais utilizados na produção de licores (Teixeira *et al.*, 2011).

1.3.3 Água

A água utilizada na produção de licores deve ser quimicamente pura, potável e de elevada qualidade, isenta de contaminação microbiana, não devendo conter sabor nem aroma (Santos e Ribeiro, 1991), em especial nos licores que são preparados por processos a frio, os quais não são sujeitos a tratamento térmico (Teixeira *et al.*, 2011).

1.3.4 Matérias vegetais

As matérias vegetais têm como principal função transmitir ao licor o sabor, aroma e cor pretendidos, sendo de elevada importância acentuar a necessidade de cuidados especiais na proporção entre as substâncias utilizadas (Teixeira *et al.*, 2011).

Os ingredientes vegetais mais usados são ervas aromáticas e frutas, estando a classificação dos licores relacionada com o predomínio de umas ou de outras. Também são usados outros produtos de origem vegetal como flores, cascas de fruta e sementes (Santos e Ribeiro, 1991).

Existem ainda licores em que o leite, produto de origem animal, o café, o chocolate e o mel são um dos constituintes principais.

1.4 Produção de licores

Os licores podem ser produzidos de diversas formas, as quais foram sendo transmitidas de geração em geração, até à produção em escala industrial. No entanto, apesar do avanço tecnológico no fabrico deste tipo de bebidas alcoólicas, o processo geral de fabrico de licores não tem sofrido grandes alterações, sendo semelhante ao utilizado pelos nossos antepassados (Teixeira *et al.*, 2011).

De acordo como o Regulamento (CE) nº110/2008, o licor pode ser obtido por aromatização de álcool etílico de origem agrícola, ou de um destilado de origem agrícola, ou de uma ou mais bebidas espirituosas, ou de uma mistura dessas bebidas, edulcorada, à qual são adicionados produtos de origem agrícola ou géneros alimentícios tais como nata, leite ou outros produtos lácteos, frutas, vinho ou vinho aromatizado.

A produção de licores divide-se habitualmente nas seguintes etapas: preparação das matérias-primas; obtenção do extrato alcoólico; mistura da água com o açúcar; adição da mistura água-açúcar ao extrato alcoólico; filtração e clarificação; armazenamento (Figura 1.1).

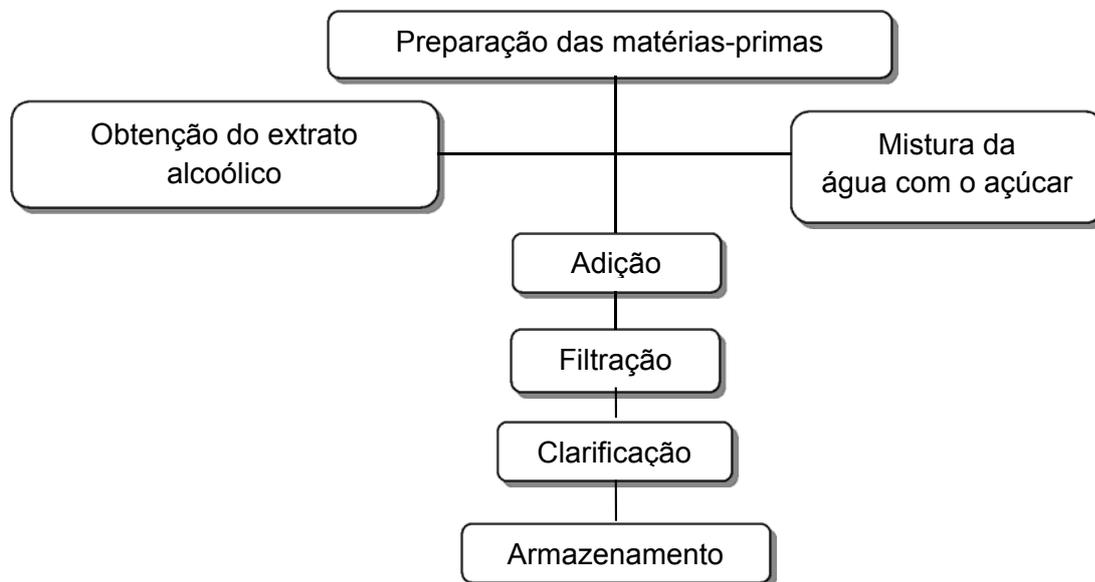


Figura 1.1. Esquema geral de produção de licores (Adaptado de Teixeira *et al.*, 2011).

1.4.1 Preparação das matérias-primas

As matérias-primas de origem vegetal *in natura* são lavadas em água corrente de qualidade. Em seguida, faz-se a sanitização com água clorada (50 mg/L de cloro residual total expressos em Cl₂, à temperatura ambiente) seguida de nova lavagem para remover o excesso de cloro. Dependendo do tipo de matérias-primas estas são descascadas, cortadas ou trituradas. No caso de matérias-primas que já foram processadas, como por exemplo o chocolate e o café torrado, não há necessidade de preparação prévia, sendo apenas pesadas (Teixeira *et al.*, 2011).

1.4.2 Obtenção do extrato alcoólico

Os métodos utilizados na obtenção dos extratos alcoólicos podem ser divididos em quatro técnicas: a maceração, a destilação, a percolação e a adição de essências (Barbosa, 2011).

O processo de maceração consiste na imersão das frutas, cascas de fruta, sumo ou ervas aromáticas em álcool ou numa bebida destilada (aguardente, vodka, whisky, conhaque) durante o tempo suficiente para que o álcool absorva os constituintes aromáticos e corantes das matérias-primas. É realizado à temperatura ambiente num recipiente muito bem fechado. O tempo de maceração depende da matéria vegetal

utilizada. Seguidamente à maceração é efetuada uma primeira filtração do líquido, o qual fica disponível para misturar os restantes compostos (Gutiérrez *et al.*, 1995).

O processo de destilação consiste em submeter o extrato filtrado, obtido após a maceração das substâncias aromatizantes no álcool, a um processo de destilação, recolhendo o condensado na forma de um líquido incolor (Teixeira *et al.*, 2011).

A percolação consiste na colocação da matéria-prima num recipiente e, através do aquecimento do álcool, os vapores ascendem e extraem os sabores e os aromas presentes nas matérias vegetais utilizadas (Licores Maduro, 2014).

Na produção de licores pode ainda ser aplicada a adição de essências, naturais ou artificiais de frutas ou de ervas, ao álcool. Este processo é o mais usado no fabrico de licores por ser mais económico e prático, uma vez que não é aplicado qualquer processo de maceração ou destilação. No entanto, a qualidade destes licores é inferior à de outros obtidos por processos diferentes (Barbosa, 2011). À mistura do álcool com as essências artificiais pode ainda ser adicionado um corante natural de origem vegetal, de forma a melhorar a aparência do produto (Santos e Ribeiro, 1991).

1.4.3 Mistura da água com o açúcar

A mistura água-açúcar é uma solução concentrada de açúcar e água, da qual dependem a consistência e suavidade do licor. A quantidade de açúcar varia de acordo com a consistência desejada para o produto final. Pelo aquecimento ocorrem a solubilização e a concentração da mistura. Uma mistura pouco concentrada está sujeita ao processo de fermentação, por outro lado, uma saturação pode levar à cristalização, pelo que é importante obter um equilíbrio entre ambos. O arrefecimento da mistura deve ocorrer naturalmente, de forma a evitar a sua cristalização (Santos e Ribeiro, 1991).

1.4.4 Adição da mistura água-açúcar ao extrato alcoólico

Esta etapa é crucial na produção de licores, uma vez que o equilíbrio entre as várias matérias-primas nas proporções corretas vai determinar a qualidade do produto final. A mistura água-açúcar é adicionada ao extrato obtido após maceração e/ou destilação, ou percolação ou pela adição de essências. Devido à volatilidade dos aromas, a adição deve ser feita sempre a frio. Após esta etapa, há um período de repouso de forma a promover a decantação dos sólidos solúveis (Teixeira *et al.*, 2011).

1.4.5 Filtração e clarificação

Os processos de filtração e clarificação têm como objetivo a redução da turbidez e evitar a formação de grânulos que depositam no fundo da garrafa, de forma a melhorar a estabilidade do produto. Durante estes processos são retidos compostos responsáveis pela

turbidez e sedimentação, tais como pectinas, hidratos de carbono e complexos tanino-proteína (Teixeira *et al.*, 2011).

A filtração é o processo mais comum utilizado para eliminar resíduos e partículas indesejáveis de um líquido, sendo parte indispensável no fabrico de licores (Santos e Ribeiro, 1991).

A clarificação é um processo mais eficiente na eliminação de partículas indesejáveis em suspensão que deixam a bebida turva e prejudicam a filtração, obstruindo os poros dos filtros. Este processo consiste em juntar um produto clarificante ao licor. Nas produções caseiras, o agente clarificante normalmente utilizado é a clara de ovo. As claras devem ser batidas em castelo com um pouco de água pura, antes de serem incorporadas no licor. A proporção utilizada é de uma clara para cada dois litros de licor (Santos e Ribeiro, 1991). A nível industrial utiliza-se a clarificação por membranas, através do deslocamento do líquido ao longo de uma membrana seletiva, submetida a uma elevada pressão que permite a passagem do líquido e dos compostos de menor densidade através dos poros (Teixeira *et al.*, 2011).

1.4.6 Conservação e armazenamento

Nesta etapa, é promovida a estabilização do licor filtrado deixando-o em repouso por alguns dias. Dessa forma, é produzido um licor mais harmonioso, cujo aroma e sabor predominante das frutas e ervas aromáticas se sobrepõe ao do álcool. Obtém-se, assim, o licor final pronto para ser engarrafado em frascos de vidro, limpos e bem vedados. Um licor de boa qualidade é límpido, não deixa sobressair o gosto do álcool e não deposita borra no gargalo. No entanto, durante o processo de envelhecimento, a cor do licor tende a ficar mais escura (Santos e Ribeiro, 1991).

A garrafa deve ser armazenada bem fechada, de pé e ao abrigo da luz de forma a evitar a evaporação do álcool e a deterioração do produto com a luz. O tempo de envelhecimento ou maturação é essencial para a qualidade do licor e para que o mesmo adquira uma personalidade de sabores e aromas característicos desta bebida. Deste modo, a maioria dos licores deve ser consumida depois de um período mínimo de três meses de envelhecimento (Teixeira *et al.*, 2011).

1.5 Classificação dos licores

Segundo a variedade do produto com que são confeccionados, os licores podem ser classificados em:

- *Licores à base de ervas*

Estes licores são geralmente elaborados por (i) maceração de diferentes ervas aromáticas em destilado de aguardente de uvas fermentadas, (ii) por destilação de aguardente de uva fermentada na presença de ervas aromáticas, (iii) por adição de extratos de ervas ao álcool destilado, ou (iv) a partir da combinação de algumas destas metodologias (Vázquez-Araújo *et al.*, 2013).

- *Licores à base de frutas*

As frutas são as matérias vegetais de eleição no fabrico de licores caseiros. A qualidade dos licores depende da escolha das frutas que devem estar em ótimo estado de maturação, de forma a conferir ao licor a sua cor e doçura característica (Barbosa, 2011). Os licores de frutas podem ser elaborados por (i) destilação com maceração prévia do fruto com o álcool, ou por (ii) maceração (Gutiérrez *et al.*, 1995).

- *Licores de essências*

Os licores de essências são elaborados através da dissolução de essências ou extratos de aromas de frutas ou ervas em álcool, sem recurso à maceração e/ou destilação ou à percolação (Santos e Ribeiro, 1991).

- *Licores à base de leite*

Os licores à base de leite são emulsões formadas por álcool, açúcar, aromas (como por exemplo, baunilha, limão e canela) e leite ou leite em pó. Pode ser adicionado também chocolate (Barbosa, 2011). O processo de produção consiste na infusão da mistura do leite com o álcool, o açúcar e os aromas (Santos e Ribeiro, 1991).

É importante referir que neste tipo de licores é necessário a adição de conservantes, espessantes e emulsificantes para promover a estabilidade e conservação da bebida alcoólica (Heffernan *et al.*, 2009).

- *Outros licores*

Existem ainda licores nos quais o café, o chocolate e o mel são a matéria-prima principal. Os licores à base de café e à base de chocolate são produzidos através da maceração da matéria-prima em álcool. No caso dos licores à base de mel, o açúcar é substituído pelo mel e o processo de produção consiste na fervura da água com o mel, seguida da adição do álcool.

1.6 Fabrico artesanal

Antigamente os licores faziam parte da economia doméstica da maioria das famílias rurais. Cada região possuía licores e aguardentes características. A maioria das receitas era transmitida de geração em geração e a elaboração própria era um orgulho (Santos e Ribeiro, 1991).

O fabrico de licores artesanais constitui uma forma de aproveitamento de matérias-primas existentes nas explorações caseiras. Além disso, o seu processamento não exige tecnologias complexas sendo que o produto final é conservado à temperatura ambiente, apresentando longa vida de prateleira. Desta forma, a produção de licores representa uma forma de contornar os problemas relacionados com a comercialização de produtos perecíveis e com aspetos visuais inferiores ao exigido pelos consumidores, dada a facilidade de conservação e o excelente valor sensorial e nutricional (Teixeira *et al.*, 2011).

1.7 Licores portugueses com indicação geográfica

Com vista a incrementar a distinção dos produtos portugueses no mercado global, surge a certificação, que defende a necessidade de uma demonstração formal de que um produto, devidamente identificado, atende aos requisitos de normas ou regulamentos técnicos específicos.

Em Portugal existem quatro licores com designação IG (indicação geográfica) registados e protegidos. São eles, o licor de Singeverga, a ginjinha portuguesa, o anis português e a poncha da Madeira.

Tal como referido no ponto 1 do artigo 20º do Regulamento (CE) nº 110/2008 relativo à definição, designação, apresentação, rotulagem e proteção das indicações geográficas das bebidas espirituosas, para cada indicação geográfica registada no anexo III do mesmo regulamento a 20 de Fevereiro de 2008, os Estados-Membros devem, até ao dia 20/02/2015, apresentar à Comissão uma ficha técnica que exponha as especificações que a bebida espirituosa em causa deve respeitar, a partir da qual a Comissão irá proceder à avaliação do cumprimento das especificações descritas na ficha técnica. A presente situação dificultou a completa caracterização dos licores portugueses com indicação geográfica.

No entanto, a 09/06/2014 foi publicado pelo Diretor-Geral da Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural a seguinte informação: "(...) não tendo sido identificado, qualquer operador económico ou agrupamento que produza ou manifeste interesse/intenção em vir a produzir a bebida espirituosa com a indicação geográfica Ginjinha Portuguesa, incluída no anexo III do Reg. (CE) nº 110/2008 procede-se a notificação edital nos seguintes termos: Notifica-se que é intenção desta Direção-Geral não apresentar à Comissão e relativamente à indicação geográfica *Ginjinha Portuguesa*, a ficha

técnica prevista no nº1 do artº 17º do Reg. (CE) nº 110/2008, facto que terá como consequência a retirada daquela bebida espirituosa do anexo III do Reg. (CE) nº 110/2008 e cessando dessa forma o seu registo”. A mesma informação foi publicada no que se refere à indicação geográfica, *Anis Portugêis*.

1.7.1 Licor de Singeverga

O licor de Singeverga, conhecido como o “Licor dos Beneditinos Portugueses” é um licor original, preparado segundo uma fórmula antiga, resultante de longas, pacientes e comprovadas experiências. Trata-se do único licor, em Portugal, genuinamente monástico, inteira e exclusivamente preparado pelos Monges Beneditinos do Mosteiro de Singeverga, em Santo Tirso. É obtido por maceração das especiarias e de uma grande variedade de plantas aromáticas em álcool etílico a 95º, seguida pela destilação da água e do álcool a que se junta depois um xarope feito com água, açúcar e ácido cítrico de forma a diminuir o teor alcoométrico para 30%. Segue-se o envelhecimento em barricas de carvalho pelo menos durante um ano, a filtração e o engarrafamento. O produto final é um licor que se impõe pela escrupulosa meticulosidade da sua preparação, pelo seu finíssimo aroma e paladar delicadíssimo (Figura 1.2; Mosteiro de Singeverga, 2014).



Figura 1.2. Licor de Singeverga (imagem de cima) e respetivo rótulo (imagem de baixo) (Mosteiro de Singeverga, 2014).

1.7.2 Ginjinha Portuguesa

A Ginjinha Portuguesa é um licor tradicional português produzido na região de Lisboa e outras localidades como Óbidos e Alcobaça. É obtida a partir da maceração prolongada (mínimo um ano) da ginja (similar à cereja, muito popular em Portugal) numa solução hidroalcoólica (aguardente vínica ou álcool) em quantidade suficiente para que o teor alcoométrico seja cerca de 18 a 20% após a adição de uma calda açucarada. Assim, este licor artesanal é feito apenas com produtos naturais, sem corantes nem conservantes (Ramos, 2008). O sabor deste licor corresponde a uma mistura de doce e amargo com um toque de canela (Garrafeira Nacional, 2014). De cor vermelho escuro, o licor apresenta duas variedades distintas: o licor simples e o licor com ginjas. As garrafas devem ser armazenadas na vertical, resguardadas do calor e da luz solar direta. Por ser um produto natural pode criar depósito.

1.7.3 Anis Português

O anis (*Pimpinella anisum*), também denominado de erva-doce, é uma planta herbácea, da família da Apiaceae, com aplicações farmacêuticas e no fabrico de bebidas alcoólicas, como por exemplo licores. O licor de anis é obtido através da aromatização do álcool etílico de origem agrícola com extratos naturais de anis verde (*Pimpinella anisum*), anis estrelado (*Illicium verum*) ou de funcho (*Foeniculum vulgare*) a partir do processo de maceração e/ou destilação, tendo como resultado uma bebida tradicional incolor e muito consumida em Portugal. O seu teor alcoométrico varia entre 25 e 30% (Garrafeira Nacional, 2014; Regulamento (CE) nº 110/2008).

1.7.4 Poncha da Madeira

A Poncha é uma bebida tradicional e emblemática da Ilha da Madeira, feita de aguardente de cana-de-açúcar, mel, açúcar e sumo de limão. No entanto, alguns constituintes podem ser alterados como é o caso do mel que pode ser substituído por sumo de maracujá ou laranja, e da aguardente de cana-de-açúcar que pode ser substituída por absinto ou mais frequentemente por whisky. O seu teor alcoométrico é de 25% (Garrafeira Nacional, 2014; Figura 1.3).

Em Março de 2014, o Decreto Legislativo Regional aprovou e confirmou a indicação geográfica protegida (IGP) “Poncha da Madeira”, regulando a sua produção e comércio. A proposta determina que a designação “Poncha da Madeira”, só pode ser usada para identificação da produção na área geográfica das ilhas da Madeira e de Porto Santo. Desta forma, a Região Autónoma da Madeira protege a bebida e o seu modo de produção, designadamente as suas matérias-primas. A proposta aprovada pelo Governo Regional estabelece que o produto deve obrigatoriamente incluir na sua produção Rum da Madeira

e que os equipamentos e os processos utilizados devem ser os mais adequados à obtenção de um produto que apresente as características sensoriais tradicionais específicas da Poncha da Madeira (IVBAM, 2014).



Figura 1.3. Rótulo de um exemplar de Poncha da Madeira (Adaptado de Garrafeira Nacional, 2014).

1.8 Licores com reconhecimento mundial

Os licores são produzidos em várias regiões do mundo, de forma artesanal ou industrial. A nível industrial, são muitos os licores que conquistaram reconhecimento mundial devido à sua qualidade e excelente sabor. São exemplos os licores produzidos em países como Holanda, França, Espanha e Itália (Teixeira *et al.*, 2011).

Podem ser classificados em três grandes grupos: licores de nome genérico produzidos no mundo inteiro a nível industrial ou artesanal (exemplos, licor de laranja, de maçã, de pêra, de anis); licores produzidos apenas no seu país de origem (exemplos, Sabra de Israel, Turkish da Turquia); e licores de marcas reconhecidas e exclusivas produzidos também, sob licença e controlo do autor da fórmula, por outras empresas (exemplos, Benedictine D.O.M., o Grand Marnier e o Amaretto Disaronno) (Santos e Ribeiro, 1991; Figura 1.4).



Figura 1.4. Licores com reconhecimento mundial (Adaptado de Garrafeira Nacional, 2014).

Destilado e envelhecido num palácio construído em Fécamp (França), o licor Benedictine, criado no século XVI pelo monge beneditino Dom Bernardo Unicell, suporta na sua produção uma subtil alquimia de vinte e sete diferentes plantas e especiarias (Marianski e Marianski, 2012). O seu sabor é tão apreciado, que o Benedictine transformou-se, até aos dias de hoje, num dos licores mais famosos e consumidos no mundo, com um teor alcoométrico de 40%. As iniciais D.O.M., que aparecem no rótulo correspondem a "Deo Optimo Maximo", ou seja, "Para Deus, o maior e o melhor" (Garrafeira Nacional, 2014; Santos e Ribeiro, 1991).

O Drambuie é um licor produzido na Escócia, que resulta da mistura de whisky de malte com mel, ervas, e uma mistura secreta de especiarias. Atualmente, o Drambuie é um dos licores mais vendidos no mundo e possui um teor alcoométrico de 40% (Garrafeira Nacional, 2014).

Grand Marnier Cordon Rouge é um licor de conhaque com sabor a laranja, criado em 1880 por Alexandre Marnier Lapostolle. É elaborado a partir de uma mistura de conhaque, essência destilada de laranja amarga e açúcar, possuindo um teor alcoométrico de 40% (Garrafeira Nacional, 2014).

Amaretto Disaronno surge em Itália no ano de 1525, em homenagem ao pintor Bernardino Luini. É um licor à base de amêndoas de damasco, misturadas com outras ervas e frutas, maceradas em aguardente com mel, possuindo um teor alcoométrico de 28%. O seu sabor aveludado e suave faz de Disaronno o licor italiano favorito (Garrafeira Nacional, 2014).

2. Aminas Biogénicas

- 2.1 Origem e classificação
- 2.2 Microrganismos produtores de aminas biogénicas
- 2.3 Função e importância
- 2.4 Toxicidade
- 2.5 Presença de AB em bebidas alcoólicas
 - 2.5.1 Vinho
 - 2.5.2 Cerveja
 - 2.5.3 Bebidas espirituosas
- 2.6 Níveis máximos legislados
- 2.7 Métodos analíticos
- 2.8 Extração
 - 2.8.1 Métodos convencionais
 - 2.8.2 Microextração
 - 2.8.2.1 Microextração em fase sólida (SPME)
 - 2.8.2.2 Microextração em fase líquida (LPME)
 - 2.8.2.3 Microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME)
- 2.9 Derivatização de aminas
 - 2.9.1 Reagentes de derivatização para Cromatografia Líquida
 - 2.9.2 Reações de derivatização para Cromatografia Gasosa
 - 2.9.2.1 Acilação
 - 2.9.2.2 Sililação
 - 2.9.2.3 Formação base de Schiff
 - 2.9.2.4 Formação de carbamatos

2.1 Origem e classificação

Aminas biogénicas (AB), ou aminas bioativas, são bases orgânicas azotadas de baixo peso molecular, com estrutura alifática (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromática (tiramina, feniletilamina) ou heterocíclica (histamina, triptamina) (Marques *et al.*, 2008; Önal, 2007). As aminas podem ainda ser classificadas quanto ao número de átomos de carbono ligadas ao azoto em aminas primárias, secundárias ou terciárias.

As AB resultam das reações primárias do catabolismo microbiano como a descarboxilação dos aminoácidos precursores correspondentes pela ação de microrganismos, através do substrato específico da enzima descarboxilase, ou por aminação e transaminação de aldeídos e cetonas (Anli e Bayram, 2009; Erim, 2013). O processo de descarboxilação dos aminoácidos livres pode ocorrer por duas vias bioquímicas: através de enzimas descarboxilase endógenas naturalmente presentes nos alimentos ou através de enzimas descarboxilase exógenas libertadas por microrganismos associados aos alimentos. A produção endógena de aminas é, no entanto, insignificante quando comparada com a via exógena.

Existem três requisitos principais para a formação de aminas biogénicas em alimentos e bebidas, são eles: a) a disponibilidade de aminoácidos livres, b) a presença de microrganismos descarboxilase-positiva e c) as condições que permitem o crescimento microbiano e a síntese e atividade da descarboxilase. Além disso, é necessário igualmente condições que possibilitem a atividade das enzimas responsáveis pelos processos de aminação e transaminação.

As principais aminas biogénicas presentes em alimentos podem ser classificadas em três grupos: histamina e aminas aromáticas, diaminas e poliaminas naturais, e aminas voláteis.

Histamina e aminas aromáticas

A histamina e as aminas aromáticas integram-se no grupo das aminas biogénicas mais estudadas em alimentos devido à possibilidade de envolvimento em problemas de intoxicação alimentar. A histamina resulta da descarboxilação do aminoácido L-histidina, sendo dotada de uma potente atividade fisiológica. A 2-feniletilamina e a tiramina são aminas aromáticas resultantes da descarboxilação dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, respetivamente (Fernandes, 2001; Figura 2.1).

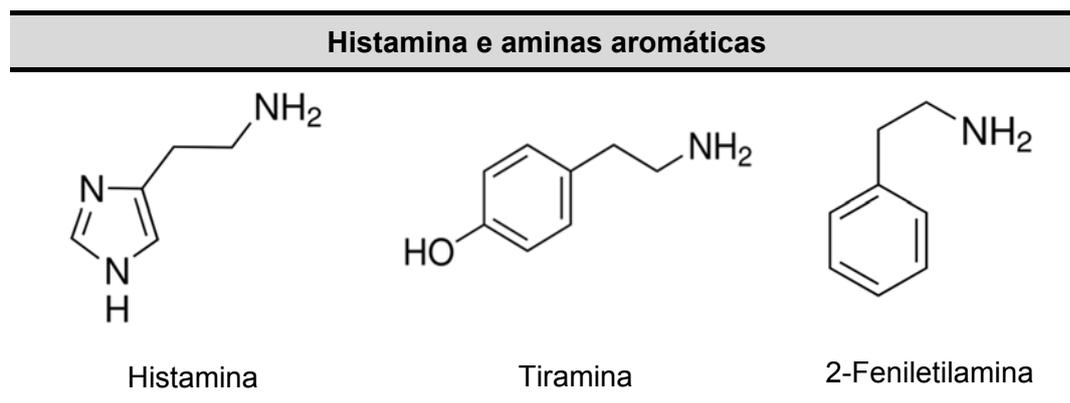


Figura 2.1. Estrutura química da histamina e das aminas aromáticas tiramina e 2-feniletilamina (Adaptado de Önal, 2007).

Diaminas e poliaminas naturais

No grupo das diaminas e poliaminas naturais, a putrescina, a espermidina e a espermina destacam-se pela sua ocorrência ubíqua em todas as células vivas, onde desempenham importantes funções ligadas ao crescimento e diferenciação celular (Tabor e Tabor, 1984). Outros compostos presentes neste grupo são a cadaverina (com estrutura semelhante à putrescina, no entanto não apresenta as mesmas origens e tem uma importância menor nos organismos vivos), o 1,3-diaminopropano e a agmatina (Chiacchierini *et al.*, 2006; Figura 2.2).

A formação da putrescina pode ocorrer por duas vias: (i) pela descarboxilação do aminoácido ornitina ou (ii) pela descarboxilação do aminoácido arginina, seguida pela transformação da agmatina em N-carbamoilputrescina e, por fim, a formação da putrescina. Por sua vez a putrescina pode dar origem à espermidina e à espermina por transferência sucessiva de grupos aminopropil, cujo dador é a S-adenosilmetionina descarboxilada, proveniente do metabolismo do aminoácido metionina, o qual cede o grupo aminopropil à putrescina formando a espermidina e à espermidina formando a espermina (Adams, 1991). Em sentido inverso, a espermina e a espermidina podem ser transformadas nos seus precursores imediatos, espermidina e putrescina, respetivamente (Seiler, 1990).

A formação da cadaverina ocorre por descarboxilação simples de um aminoácido, a lisina, sendo poucas as referências na literatura à disseminação na natureza da enzima lisina-descarboxilase responsável pelo processo (Fernandes, 2001).

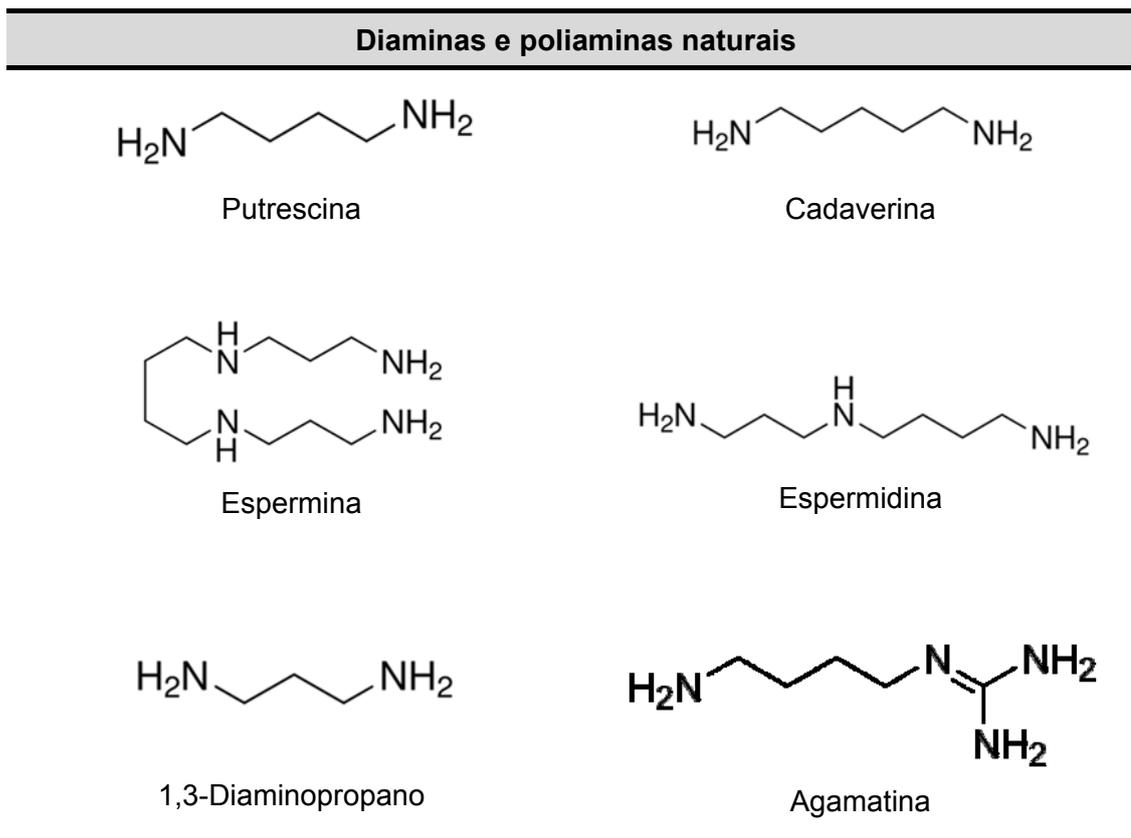


Figura 2.2. Estrutura química das diaminas e das poliaminas naturais (Adaptado de Önal, 2007).

Aminas voláteis

As aminas voláteis englobam as monoaminas alifáticas de baixa massa molecular, como por exemplo a metilamina, a etilamina, a dimetilamina, a dietilamina, a isopropilamina, a isobutilamina, a isoamilamina, a 2-metilbutilamina e a amilamina; e as aminas alicíclicas pirrolidina, morfolina e piperidina (Figura 2.3).

A pirrolidina, morfolina e piperidina bem como as aminas secundárias, dimetilamina e a dietilamina estão relacionadas com problemas de toxicidade devido à sua capacidade de, na presença de nitritos, serem transformadas nas N-nitrosaminas correspondentes. As aminas alifáticas de baixa massa molecular são geralmente classificadas entre as mais tóxicas substâncias usadas rotineiramente em escala industrial (Manahan, 1992).

A principal origem deste tipo de compostos reside na aminação enzimática de aldeídos e cetonas. No entanto, existe também registos da sua formação por descarboxilação de aminoácidos durante os processos de escurecimento não enzimático que podem ocorrer em muitos alimentos durante a cozedura. Pelo contrário, a formação de aminas voláteis por meio da descarboxilação enzimática de aminoácidos não parece ter grande expressão; está, contudo, referida a sua ocorrência em algumas plantas, designadamente na origem da etilamina (Crocomo e Fowden, 1970).

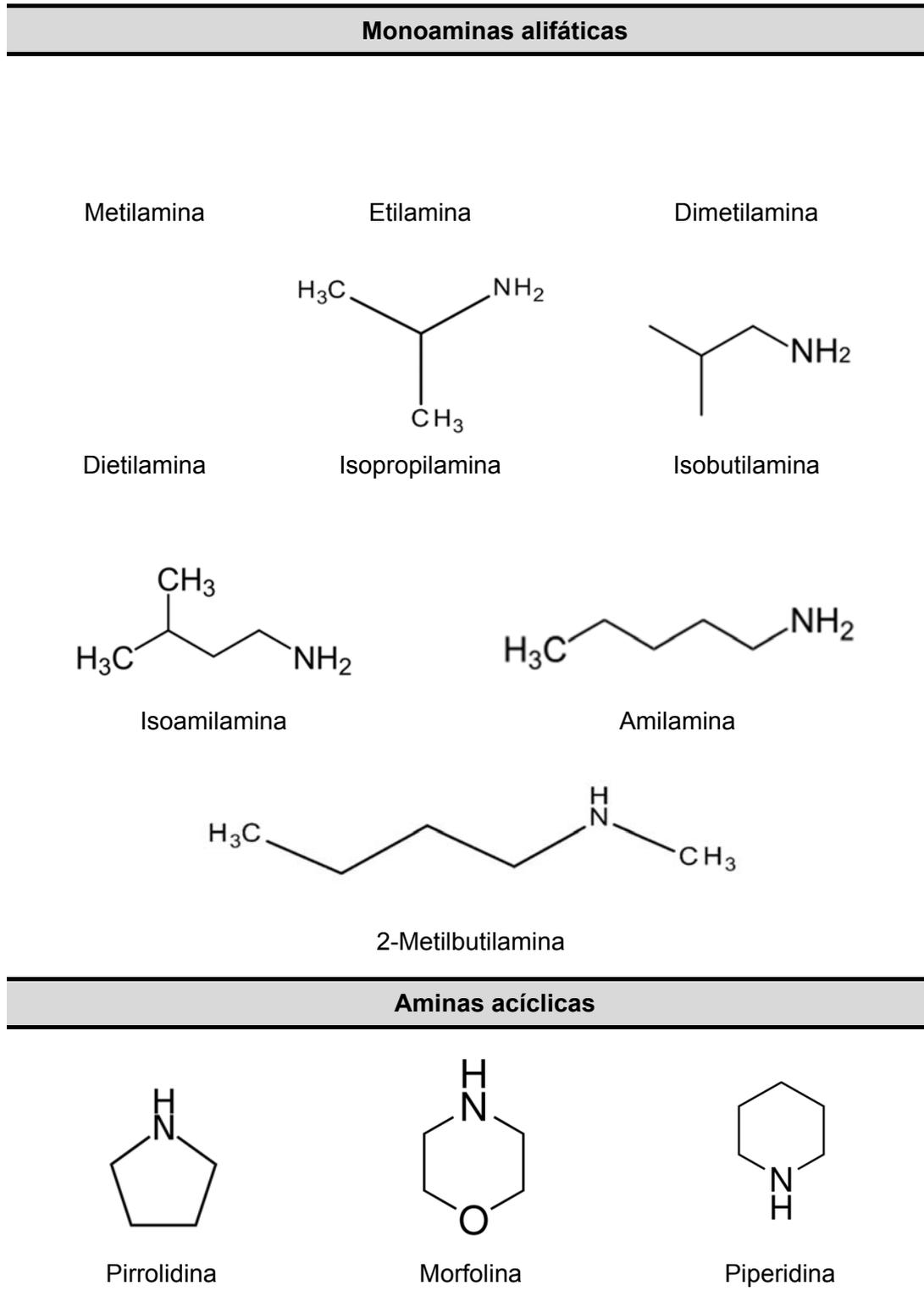


Figura 2.3. Estrutura química das aminas voláteis - monoaminas alifáticas e aminas acíclicas (Adaptado de Önal, 2007).

Dependendo da sua origem, as aminas biogénicas são definidas como:

- Aminas exógenas, como, histamina, tiramina, 2-feniletilamina, as quais aparecem nos alimentos com maior exposição à atividade de microrganismos durante o processamento ou armazenamento, como peixe, carne e produtos cárneos, queijo, cerveja e vinho (Erim, 2013; Leitão *et al.*, 2005; Prete *et al.*, 2009; Santos, 1996);

- Aminas endógenas, como as poliaminas naturais, que aparecem naturalmente em plantas e animais resultando de processos metabólicos intracelulares, e estão presentes nos alimentos em concentrações não tóxicas, sendo essenciais para diversos organismos vivos (Önal, 2007).

Concentrações elevadas de aminas biogénicas foram encontradas em alimentos fermentados como resultado de uma microflora contaminante que manifesta atividade de descarboxilação de aminoácidos (Önal, 2007) e como mecanismo de proteção dos microrganismos contra o meio ácido envolvente, uma vez que a produção de AB induz o aumento do valor de pH (Anli e Bayram, 2009).

As aminas biogénicas mais abundantes em alimentos são a metilamina, a etilamina, a dimetilamina, histamina, a tiramina, a cadaverina, a 2-feniletilamina, a espermina, a espermidina e a putrescina (EFSA, 2011; Naila *et al.*, 2010).

A quantidade e tipo de aminas biogénicas presentes em alimentos é fortemente influenciada pelas características intrínsecas dos alimentos como, pH, atividade da água, composição microbiota e por parâmetros extrínsecos, tais como tempo e temperatura de armazenamento que permitem o crescimento bacteriano durante o processamento e o armazenamento de alimentos (EFSA, 2011).

2.2 Microrganismos produtores de aminas biogénicas

Espécies de bactérias do ácido láctico (BAL) como *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus* spp. estão associadas à produção de aminas biogénicas durante o processo de vinificação. No caso dos queijos, as principais BAL produtoras de AB são os géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, descritas como as principais produtoras de histamina e tiramina (Spano *et al.*, 2010).

Bover-Cid *et al.* (2014) referem o grupo das Enterobacteriáceas, incluindo os mesófilos *Morganella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Proteus*, etc. e o *Photobacterium phosphoreum* como as bactérias produtoras de histamina mais prolíficas no peixe. Muitas estirpes de Enterobactérias isoladas de carne e vegetais têm sido associadas à produção das diaminas, putrescina e cadaverina.

Outros microrganismos pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, e *Bacillus* também foram encontrados como produtores de aminas biogénicas (Bover-Cid *et al.*, 2014).

2.3 Função e importância

Em baixas concentrações, as aminas biogénicas são essenciais para muitas funções fisiológicas no organismo tais como proliferação e diferenciação celular (Marques *et al.*, 2008), incluindo a regulação do crescimento (espermina, espermidina e cadaverina), a transmissão neural (catecolamina e serotonina), mediação de processos de inflamação (histamina e tiramina) e a regulação da temperatura corporal e do pH do estômago (Anli e Bayram, 2009; Önal, 2007).

2.4 Toxicidade

A elevada ingestão de AB pode dar origem a alterações no organismo e causar dores de cabeça, dificuldades respiratórias, hipertensão e alergias e, em casos graves, hemorragia intracelular e até mesmo a morte (Prete *et al.*, 2009). Algumas aminas aromáticas (é o caso da tiramina, triptamina, e 2-feniletilamina) apresentam uma ação vasoconstritora, podendo originar uma forte constrição de todo o sistema vascular e a estimulação do músculo cardíaco, enquanto outras (histamina e serotonina) apresentam um efeito vasodilatador.

A putrescina, a espermina, a espermidina e a cadaverina podem reagir com nitritos e formar nitrosaminas cancerígenas (Kataoka, 1996; Önal, 2007). É importante referir ainda o efeito potenciador de várias aminas devido às enzimas que as metabolizam serem as mesmas. Um exemplo deste acontecimento é a presença da putrescina em alimentos juntamente com a histamina e a tiramina, que podem potenciar os fenómenos de intolerância/intoxicação, devido à sua contribuição para a inibição das enzimas gastrointestinais responsáveis pela degradação daqueles compostos.

As intoxicações alimentares mais frequentes provocadas por AB envolvem a histamina. A ingestão de 5-10 mg de histamina pode ser considerado lesivo para algumas pessoas sensíveis, 10 mg é considerado tolerável, 100 mg induz alta toxicidade e 1000 mg é altamente tóxico (Karovičová e Kohajdová, 2005).

Além dos efeitos toxicológicos, as aminas biogénicas são motivo de preocupação no que respeita à higiene dos alimentos, dado que quantidades elevadas de certas aminas podem ser encontradas em alimentos como consequência da utilização de matérias-primas de menor qualidade e condições inadequadas durante o processamento e armazenamento de alimentos, em especial a putrescina e a cadaverina (Önal, 2007).

2.5 Presença de AB em bebidas alcoólicas

2.5.1 Vinho

Em vinhos, a concentração de AB varia consoante a cultivar, o tipo, composição e adubação do solo, as condições climáticas durante o crescimento da videira, o grau de maturação das uvas, o método utilizado na elaboração do vinho, o processo de clarificação e o tratamento enológico do vinho, bem como a estirpe de levedura usada na fermentação (Cecchini e Morassut, 2010; Marques *et al.*, 2008).

De facto, a variedade da uva parece desempenhar um papel significativo no teor inicial de AB presentes no mosto de uvas, devido ao tipo de aminoácidos presentes nas diferentes cultivares e à presença de microflora bacteriana natural nas uvas (Marques *et al.*, 2008). Adicionalmente, o tempo de armazenamento das uvas na adega e o estado sanitário da adega conduzem a uma interação entre as uvas e os microrganismos (leveduras e/ou bactérias) presentes na adega, o que pode causar um aumento descontrolado das AB presentes (Cecchini e Morassut, 2010). Além disso, as condições de fermentação tais como temperatura, pH, disponibilidade de oxigénio e conteúdo em cloreto de sódio são fatores importantes que podem aumentar a quantidade de aminas biogénicas no produto acabado (Anli e Bayram, 2009).

No que respeita à presença de aminas biogénicas em vinhos tintos e em vinhos brancos, estas são mais frequentes em vinhos tintos. Este facto pode ser explicado pelas diferentes técnicas de fabrico; ao contrário do vinho branco, o vinho tinto é preparado na presença da película das uvas e estas são submetidas a alguma pressão, conduzindo à indução de maior quantidade de nutrientes e ao favorecimento da atividade microbiana (Marques *et al.*, 2008).

Prete *et al.* (2009) simularam a fermentação alcoólica e maloláctica de sete cultivares de uvas (do ano 2004 e 2005) em condições assépticas, usando bactérias e leveduras que em estudos anteriores mostraram ser incapazes de produzir aminas biogénicas tendo concluído que a presença de algumas aminas biogénicas em vinhos se deve à variedade da uva, à presença destes compostos nas uvas intensificados pelas alterações climáticas, e aos processos metabólicos das leveduras e bactérias durante a fermentação. Com este estudo, os autores verificaram que as aminas etilamina e putrescina estão naturalmente presentes nas uvas. A putrescina diminui com a fermentação alcoólica possivelmente devido ao facto de a putrescina ser uma intermediária na biossíntese de poliaminas (espermidina e espermina) e ser usada pelas leveduras no seu metabolismo. A etilamina também diminui com a fermentação alcoólica, pois é empregue como fonte de carbono e azoto pelas leveduras. A agmatina e a tiramina (que não estavam presentes no mosto) aparecem no vinho no final da fermentação alcoólica ou da fermentação maloláctica, como resultado dos processos metabólicos das leveduras e das bactérias do ácido láctico.

Propondo analisar o comportamento das aminas voláteis (metilamina, etilamina e isoamilamina) durante o processo fermentativo, Fernandes (2001) concluiu haver uma queda brusca dos teores observados logo após o início do processo fermentativo, provavelmente devido ao facto de serem assimiladas pelas leveduras e usadas no seu crescimento. Durante o envelhecimento do vinho, o conteúdo de aminas biogénicas tende a aumentar (principalmente histamina e a tiramina, produzidas no início do processo de envelhecimento), mas não se acumulam no vinho devido à sua degradação (Ancín-Azpilicueta *et al.*, 2008). Por outro lado, Fernandes (2001) conclui que a putrescina, a cadaverina, a metilamina e a etilamina têm tendência a diminuir com o aumento da idade do vinho do Porto do tipo "Tawny" e do tipo "Vintage", envelhecido em vasilhame de madeira e engarrafado num período de dois a três anos após o processo de vinificação, respetivamente. Inversamente às aminas enunciadas está a pirrolidina, a qual tende a aumentar ao longo do envelhecimento dos dois tipos de vinho. As aminas dimetilamina, isobutilamina, 2-feniletilamina e tiramina não sofrem alterações significativas durante o envelhecimento dos vinhos.

As principais aminas biogénicas presentes no vinho são a histamina, a putrescina, a tiramina, a feniletilamina e a cadaverina (Leitão *et al.*, 2005; Proestos *et al.*, 2008; Romano *et al.*, 2012). A metilamina, a etilamina e a isoamilamina constituem, dentro do grupo das aminas voláteis, aquelas cuja presença nos vinhos e mostos é apresentada pelos diversos autores como mais constante e significativa, das quais a metilamina e a etilamina aparecem em maiores quantidades nas uvas (Fernandes, 2001).

Relativamente à presença de diaminas e poliaminas naturais, a putrescina tem maior incidência do que a cadaverina (constituindo mesmo, em muitos casos, a amina biogénica mais abundante presente nos vinhos) e com teores mais elevados em vinhos tintos do que em vinhos brancos (Fernandes, 2001).

Segundo Ancín-Azpilicueta (2008) e Anli e Bayram (2009), a presença de aminas biogénicas no vinho pode ser controlada através de uma higiene rigorosa aplicada às matérias-primas e aos ambientes de produção. A utilização de uvas saudáveis, a menor aplicação de fertilização azotada, o tipo de levedura, a seleção de bactérias de ácido láctico com baixa capacidade aminogénica e processos curtos de maceração são alguns dos processos que podem ser controlados. De facto, é muito difícil, ou mesmo impossível, obter vinhos sem quaisquer aminas biogénicas, mantendo todas as suas propriedades sensoriais. Controlando os fatores tecnológicos críticos, é possível, porém, a produção de vinhos com baixos níveis de aminas biogénicas.

2.5.2 Cerveja

A cerveja é obtida a partir de cereais fermentados, geralmente cevada maltada, e aromatizada com lúpulo. Durante a produção de cerveja, a fermentação alcoólica ocorre pela ação de leveduras selecionadas, tais como *Saccharomyces cerevisiae* (alta fermentação), *Saccharomyces carlsbergensis* (baixa fermentação), juntamente com leveduras selvagens e BAL que, além dos produtos de fermentação produzem outros compostos, tais como as aminas biogénicas (Almeida *et al.*, 2012).

Segundo Tang *et al.* (2009), a estrutura e concentração das aminas biogénicas presentes em cervejas depende principalmente das matérias-primas, das técnicas de fabrico da cerveja e das condições de higiene. Deste modo, a presença de maiores quantidades de histamina e a tiramina em cervejas tem sido associado à contaminação microbiana do malte e da cevada (Halász *et al.*, 1999). Por outro lado, a putrescina, a agmatina, a espermidina e a espermina são consideradas constituintes naturais da cerveja, obtidas através do malte, enquanto a tiramina e 2-feniletilamina podem estar presentes no lúpulo (Almeida *et al.*, 2012).

Além destas aminas biogénicas, outras aminas frequentemente negligenciadas pelos investigadores podem ser encontradas em cervejas como resultado da aminação ou transaminação reductiva do aldeído ou cetona correspondente, tais como a etilamina, a metilamina, a dimetilamina e a pirrolidina (Kalač e Křížek, 2003). Estas aminas alifáticas de cadeia curta ou acíclicas podem reagir com agentes nitrificantes, levando à formação de N-nitrosaminas potencialmente cancerígenas (Almeida *et al.*, 2012).

Após a análise de 13 amostras de cerveja, alcoólicas e não alcoólicas, Fernandes *et al.* (2001) verificaram que a putrescina e a tiramina estavam presentes em concentrações elevadas; no entanto, em nenhuma das amostras o nível total de 10 mg/L foi alcançado, um limite considerado seguro para os consumidores.

A histamina, a tiramina, a feniletilamina e a putrescina são as principais aminas biogénicas encontradas em cerveja (Tang *et al.*, 2009).

2.5.3 Bebidas espirituosas

No que respeita à presença de aminas biogénicas em bebidas espirituosas como, licores, whisky, vodka, conhaque, anis ou aguardente até à data, não existem estudos publicados. O mesmo não se verifica em bebidas fermentadas tradicionais da Turquia, como por exemplo a boza. A boza é uma bebida à base de milhete, milho, trigo ou arroz, fermentada por leveduras e BAL e com baixo teor alcoólico. Yeğın e Üren (2008) avaliaram a presença de aminas biogénicas em 10 amostras de boza de diferentes produções. Das 11 aminas biogénicas em estudo a putrescina, a espermidina e a tiramina foram detetadas em todas as amostras de boza. A tiramina foi a amina mais abundante, com concentrações

entre 13 e 65 mg/kg. A concentração total de aminas biogénicas em amostras de boza situou-se entre 25 e 69 mg/kg, valor inferior ao limite de 100-200 mg/kg referenciado por Nout (1994). Num estudo efetuado por Cosansu (2009) a 21 amostras de boza, 18 continham pelo menos uma amina biogénica das 6 pesquisadas. As aminas pesquisadas foram a tiramina, a cadaverina, a triptamina, a putrescina, a 2-feniletilamina e a histamina com concentrações máximas de 82,79; 17,69; 13,78; 9,80; 4,53 e 4,07 mg/kg, respetivamente. A concentração total de aminas biogénicas variou entre 1,67 e 101,14 mg/kg. Perante estes valores, é importante ter em atenção o risco associado ao consumo deste tipo de bebidas alcoólicas devido ao seu teor elevado de aminas biogénicas.

2.6 Níveis máximos legislados

Atualmente, os limites máximos legais de aminas biogénicas estão apenas definidos para a histamina em determinados produtos de peixe e marisco, principalmente espécies de peixes associadas a altos níveis do aminoácido histidina (Bover-Cid *et al.*, 2014).

De acordo com a Directiva do Conselho (91/493/CEE) o limite máximo de histamina em peixes da família *Sombridae* (por exemplo, atum e cavala) e *Clupeidae* (por exemplo, sardinha) é de 100 mg/kg de peixe fresco. Segundo o Regulamento (CE) n° 1441/2007, que altera o Regulamento (CE) n° 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, o limite máximo de histamina situa-se entre 100 e 200 mg/kg de peixe fresco com elevado teor de histidina. Por outro lado, a Food and Drug Administration (FDA, 2011) aponta um limite máximo de histamina de 50 mg/kg de peixe fresco.

Em vinhos ainda não foram estabelecidos limites máximos de AB pela Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV). No entanto, alguns países estabeleceram um limite máximo para o conteúdo de histamina em vinho (2 mg/L na Alemanha, 6 mg/L na Bélgica, 10 mg/L na Suíça e na Áustria, 8 mg/L na França e 4 mg/L na Holanda). O limite máximo de aminas biogénicas considerado seguro para os consumidores é de 10 mg/L (Marques *et al.*, 2008).

2.7 Métodos analíticos

Existem duas razões para a determinação de aminas em alimentos e bebidas: a sua potencial toxicidade e a possibilidade de as usar como marcadores de qualidade dos mesmos (Önal, 2007; Anli e Bayram, 2009). Normalmente as análises são efetuadas em matérias-primas, produtos intermédios e produtos finais, bem como na monitorização de processos de fermentação, controlo de processos e no desenvolvimento de pesquisas (Prete *et al.*, 2009).

Independentemente do tipo de matriz, a quantificação de aminas biogénicas é uma operação com um elevado grau de dificuldade devido a dois fatores fundamentais: por um

lado, o acentuado carácter polar dos compostos que dificulta a sua extração de matrizes aquosas com bom rendimento e livres de compostos interferentes e, além disso, é fonte de problemas quando se pretende a sua separação cromatográfica. Por outro lado, a ausência de propriedades intrínsecas dos compostos que possibilitem a sua deteção diretamente por métodos físico-químicos de aplicação corrente, como, por exemplo, métodos espectrofotométricos, métodos fluorimétricos ou métodos eletroquímicos (Fernandes, 2001).

Usualmente as aminas biogénicas são determinadas por técnicas de separação como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar e cromatografia gasosa (GC), envolvendo deteção espectrofotométrica, fluorimétrica ou por espectrometria de massa (Anli e Bayram, 2009; Önal *et al.*, 2013).

2.8 Extração

A etapa de extração/purificação dos compostos a analisar é considerada crítica na qualidade dos resultados obtidos. As principais dificuldades observadas no processo de extração das aminas resultam a) da elevada complexidade da matriz, b) da elevada polaridade dos compostos, de que resulta uma maior solubilidade em água do que na maioria dos solventes orgânicos geralmente usados, c) dos baixos teores em que se encontram habitualmente presentes, d) da coexistência, geralmente em quantidades muito superiores, de diversos aminoácidos, alguns dos quais se apresentam como interferentes nos processos de determinação propriamente ditos, dada a existência de algumas similitudes estruturais, e) finalmente, da necessidade de se extraírem moléculas estruturalmente diferentes (histamina, putrescina e tiramina, por exemplo) (Önal, 2007).

Apesar dos avanços no desenvolvimento da instrumentação analítica altamente eficiente para a determinação de analitos, a etapa de extração é fundamental e inevitável para a obtenção de resultados precisos. Uma variedade de técnicas de extração e de enriquecimento são usados com esta finalidade (Farajzadeh *et al.*, 2014).

2.8.1 Métodos convencionais

São dois os processos extrativos convencionais normalmente utilizados: extração líquido-líquido (LLE) com um solvente ou uma mistura de solventes apropriados, imiscíveis com a água, no qual o(s) composto(s) de interesse sejam mais solúveis; e extração em fase sólida, fazendo uso de colunas cromatográficas preparadas no laboratório revestidas com um adsorvente apropriado ou de cartuchos de extração atualmente comercializadas já com o respetivo enchimento (designadas por SPE) (Orlando *et al.*, 2009).

Os solventes mais usados na extração líquido-líquido são o butanol, uma mistura de acetoneitrilo e ácido perclórico 0,2N (1:1), dupla extração (primeiro com éter etílico e depois

com etanol) e o diclorometano. Esta técnica requer grandes quantidades de amostras e de solventes orgânicos, os quais são tóxicos e perigosos para a saúde e para o meio ambiente. Além disso, a formação de emulsões, o baixo fator de enriquecimento, o custo elevado e o consumo de tempo são outras desvantagens desta técnica (Farajzadeh *et al.*, 2014).

Na extração em fase sólida, o uso de colunas cromatográficas preparadas em laboratório com resinas ácidas com propriedades de troca de catiões foi comum durante algum tempo. Em 1997 surge o uso de colunas SPE com enchimento do tipo sulfônico (SCX), usando como eluentes mistura de borato de sódio 0,075M e metanol (50:50), ou uma solução de HCl 1M em metanol a 95% (Busto *et al.*, 1997). Esta técnica apresenta fatores de enriquecimento mais elevados do que a LLE; no entanto, apresenta os mesmos problemas de ser demorado e o uso de quantidades apreciáveis de solventes tóxicos (Farajzadeh *et al.*, 2014).

Paralelamente a estas duas técnicas, Fernandes e Ferreira (2000) procuraram desenvolver uma técnica extrativa que fosse precisa e seletiva, designada por extração por par-iônico. Esta corresponde à extração de compostos ionizáveis presentes em soluções aquosas por intermédio de solventes orgânicos aos quais se adiciona um ião de carga contrária (contra-ião), capaz de formar com os compostos a extrair um par-iônico cujas características de solubilidade favorecem a sua transferência para a fase orgânica em detrimento da sua permanência na fase aquosa. Pares-iônicos são espécies neutras formadas pela atração electrostática entre partículas, numa solução, carregadas com cargas de sinal oposto. O agente de eleição para a extração de aminas fortemente hidrofílicas é o hidrogenofosfato de bis(2-etil-hexilo) (BEHPA). O principal interesse deste processo de extração reside na possibilidade de "desenhar" processos extrativos extremamente seletivos para determinado composto ou grupo de compostos, de elevado rendimento e reprodutibilidade e fáceis de executar.

2.8.2 Microextração

Métodos de preparação de amostras miniaturizados combinados com técnicas cromatográficas proporcionam várias vantagens como a elevada velocidade e eficiência de análise, o baixo custo operacional bem como o baixo consumo de solventes, a implementação de procedimentos analíticos ecológicos e análise de dados altamente seletiva. No entanto, as técnicas de microextração são um desafio no que se refere a miniaturização do laboratório analítico (Viñas *et al.*, 2014).

2.8.2.1 Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME) foi introduzida por Arthur e Pawliszyn em 1990, tendo em vista a análise de compostos voláteis por GC (Arthur e Pawliszyn, 1990). Com o desenvolvimento de novos materiais de extração, a SPME foi sendo adaptada à técnica de HPLC e aos mais diversos tipos de matrizes e classes de compostos (Alpendurada, 2000). É uma técnica que utiliza uma fibra de sílica fundida recoberta com um adsorvente adequado para a concentração de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis numa única etapa de extração (Farajzadeh *et al.*, 2014). A fibra encontra-se acondicionada dentro de uma agulha contida num amostrador semelhante a uma seringa, ficando exposta somente no momento da extração (Orlando *et al.*, 2009).

O processo de extração por SPME pode ser realizado por imersão direta da fibra na amostra ou por *headspace*, técnica em que a fibra não contacta diretamente com a amostra, mas apenas com os vapores libertados por aquecimento da mesma. Após a extração pela fibra, o analito pode ser desorvido através de aquecimento para a análise por GC ou em quantidades reduzidas de um solvente adequado para a análise por HPLC (Orlando *et al.*, 2009).

A otimização deste processo de microextração deve ter em consideração os seguintes fatores: polaridade e espessura do revestimento da fibra; método de amostragem (em *headspace* ou imersão da fibra); pH e teor de sal da amostra; agitação da amostra. Analitos apolares são mais eficazmente extraídos com uma fibra de revestimento apolar enquanto analitos polares são mais eficazmente extraídos com uma fibra dotada de polaridade (Kataoka *et al.*, 2000). A agitação da amostra facilita e reduz o tempo de extração, em especial para os analitos de maior peso molecular. Os analitos que apresentam uma elevada pressão de vapor podem ser extraídos por *headspace*. Analitos com baixa pressão de vapor são extraídos por imersão da fibra (Alpendurada, 2000). A adição de sal a amostras aquosas aumenta grandemente a eficiência da extração de muitos analitos, especialmente os compostos polares voláteis, por via do efeito salting-out (Supelco, 1998).

DeBruin *et al.* (1999) propuseram a utilização de uma fibra com 65 µm, revestida com polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) na extração de aminas aromáticas em amostras de leite humano por *headspace* e posterior quantificação por GC-MS. Os autores detetaram as aminas aromáticas monocíclicas, anilina, o-toluidina e N-metilanilina potencialmente carcinogénicas, em µg/L, o que demonstrou ser um bom resultado para este tipo de análises. A fibra revestida com PDMS/DVB é bipolar, indicada para a análise de analitos voláteis e não voláteis de baixa a alta polaridade.

Comparativamente com métodos de extração convencionais, a SPME tem muitas vantagens, tais como a portabilidade, simplicidade, eliminação de solventes, elevada eficiência de concentração e a economia de tempo (Kataoka *et al.*, 2000). No entanto, a

natureza frágil, o tempo de vida limitado e o elevado custo das fibras são os principais problemas comumente encontrados com a SPME (Farajzadeh *et al.*, 2014). Além disso, existe dificuldade em fazer uma análise quantitativa pois o comportamento dos padrões pode ser muito diferente do comportamento das amostras.

2.8.2.2 Microextração em fase líquida (LPME)

A fim de superar as desvantagens da SPME, em 1996 foi desenvolvida a microextração em fase líquida (LPME) (Jeannot e Cantwell, 1996), baseada na utilização de uma gota com 1 a 10 μL de um solvente orgânico imiscível em água contida na ponta de uma seringa exposta à solução aquosa. Nesta técnica, também denominada de microextração em gota única (SDME), os analitos são extraídos e concentrados num único passo (Jeannot e Cantwell, 1997), permitindo uma elevada eficiência de extração a partir de uma fase aquosa contendo os analitos, usando uma quantidade mínima de solvente orgânico (Rezaee *et al.*, 2010).

Apesar da simplicidade da SDME, a principal desvantagem desta técnica é a instabilidade da gota suspensa durante a extração. De forma a contornar este problema, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (1999) propuseram a ideia de colocar a pequena gota de solvente orgânico dentro de uma membrana de fibra oca hidrofóbica porosa composta por polipropileno, da qual nasceu a técnica de microextração em fase líquida com fibra oca (LPME-HF). Esta técnica tem sido eficazmente aplicada na extração de aminas como aminas primárias (Chia e Huang, 2006) e aminas aromáticas (Zhao *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2010), em amostras de água.

De facto, a LPME encontrou um papel importante na extração de compostos orgânicos e inorgânicos, a partir de amostras de água, devido à simplicidade da matriz e ao facto de o procedimento ser aplicado diretamente após operações simples, tais como filtração, centrifugação e ajuste do pH. No entanto, a complexidade das matrizes alimentares faz com que a sua aplicação neste domínio seja problemática. Assim, a análise de alimentos geralmente requer uma extração prévia ou uma etapa de limpeza, especialmente em amostras sólidas, seguida de reconstituição num meio aquoso para a realização da LPME (Viñas *et al.*, 2014).

2.8.2.3 Microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME)

Rezaee *et al.*, (2006) desenvolveram uma nova técnica de microextração designada por microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME), aplicada a compostos orgânicos e inorgânicos. Nesta técnica, uma mistura de um solvente de extração com um solvente de dispersão é rapidamente injetada na fase aquosa (amostra), ocorrendo a formação de uma fase turva, provocada pela formação de gotas finas que se dispersam na fase aquosa

(Almeida *et al.*, 2012; Figura 2.4). As gotículas emulsionadas têm uma elevada área superficial e, conseqüentemente, o equilíbrio da reação é alcançado rapidamente e a extração é quase instantânea. Após a extração, a mistura turva é centrifugada e as gotas finas da fase de extração acumulam-se no fundo do tubo – fase inferior. A fase inferior é injetada no sistema cromatográfico ou determinada diretamente. A principal vantagem desta técnica são os elevados fatores de enriquecimento e recuperação. Almeida *et al.* (2012) afirmam ser uma técnica de sucesso na extração de compostos com propriedades lipofílicas como hidrocarbonetos aromáticos, aminas aromáticas e resíduos de pesticidas. Além disso é uma técnica simples, rápida e de baixo custo (Berijani *et al.*, 2006; Zgoła-Grzeškowiak e Grzeškowiak, 2011).

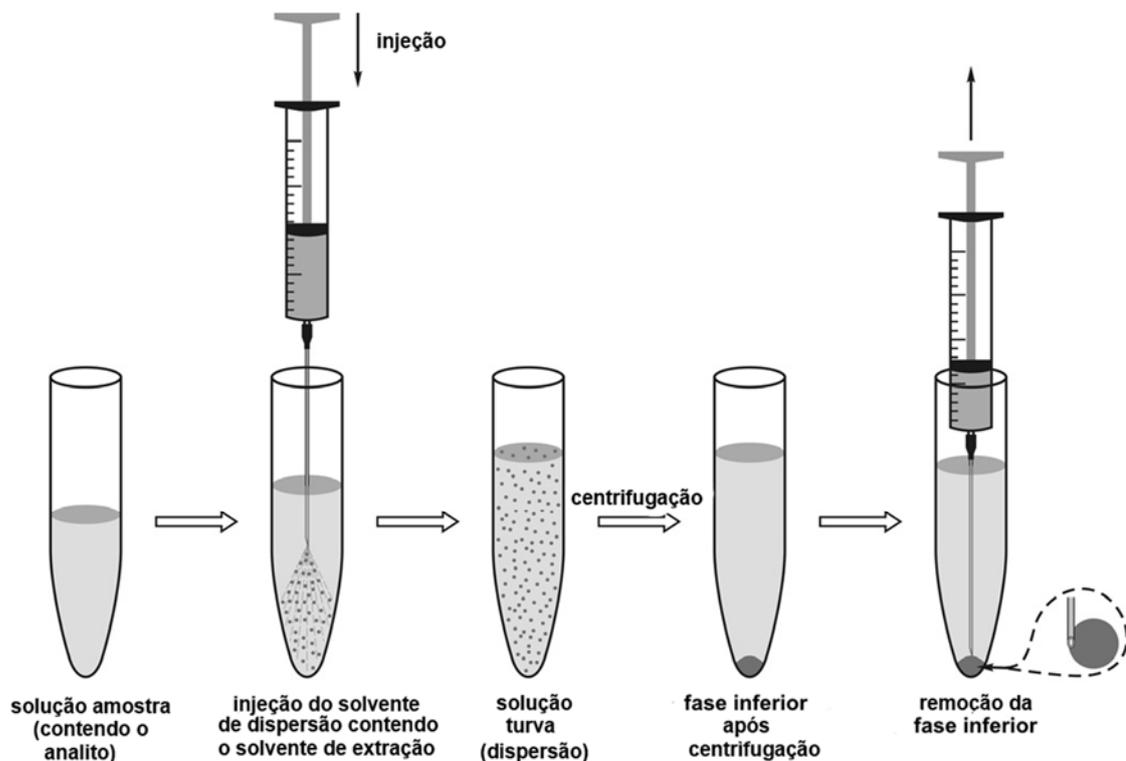


Figura 2.4. Procedimento de microextração dispersiva líquido-líquido (Adaptado de Zgoła-Grzeškowiak e Grzeškowiak, 2011).

A DLLME é uma técnica adequada para a análise de amostras com uma matriz relativamente simples, tais como amostras de água. No entanto, o interesse e o número de aplicações em outras áreas, como análise de alimentos, têm aumentado nos últimos anos. Devido à interação entre os componentes da matriz deste tipo de amostras com os solventes orgânicos, torna-se mais difícil a obtenção de uma fase inferior apropriada à injeção em cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia líquida (LC). Assim, para amostras

de alimentos, etapas de diluição ou de pré-tratamento da amostra, incluindo a extração e/ou etapa de limpeza, são necessárias (Viñas *et al.*, 2014).

Vários parâmetros, como a natureza e o volume dos solventes de extração e de dispersão têm grande influência na eficácia da extração por DLLME e devem ser considerados. O solvente de extração utilizado é um dos fatores mais importantes que influenciam a eficiência do processo extrativo. Os solventes orgânicos são selecionados de acordo com a sua densidade ser superior à da água, a capacidade de extração dos analitos de interesse, a capacidade para formar uma solução turva, a estabilidade, a baixa solubilidade em água, e o seu comportamento cromatográfico (Rezaee *et al.*, 2006). Hidrocarbonetos halogenados tais como clorofórmio, tetracloreto de carbono, tetracloroetileno, tetracloroetano, dicloroetano, diclorometano e misturas como clorofórmio-diclorometano, tetracloreto de carbono-dibromometano e clorobenzeno-clorofórmio são normalmente selecionados como solventes de extração, devido à sua elevada densidade, sendo o clorofórmio e o tetracloreto de carbono os mais utilizados (Viñas *et al.*, 2014).

Na seleção do solvente de dispersão, a sua miscibilidade com o solvente de extração (fase orgânica) e com a fase aquosa é um parâmetro essencial. Acetona, metanol, acetonitrilo, 2-propanol e etanol são solventes de dispersão comuns, destacando-se o acetonitrilo e o metanol como os mais utilizados (Viñas *et al.*, 2014). De forma a evitar perdas de solvente durante a extração, os solventes de extração e de dispersão devem possuir baixa pressão de vapor e elevada temperatura de ebulição (Martins *et al.*, 2012).

O volume do solvente de extração tem um efeito importante no fator de enriquecimento. Quanto maior for o volume de solvente de extração, maior será o volume da fase inferior obtida após centrifugação e, conseqüentemente, menor será o fator de enriquecimento (Martins *et al.*, 2012). Assim, o volume ideal deve garantir elevados fatores de enriquecimento e um volume suficiente de fase inferior para posterior análise (Viñas *et al.*, 2014).

O volume do solvente de dispersão afeta diretamente a formação da solução turva (água/solvente de dispersão/solvente de extração), o grau de dispersão do solvente de extração na fase aquosa e, conseqüentemente, a eficiência da extração. Variações do volume de solvente de dispersão alteram o volume da fase sedimentada. Assim, é necessário alterar os volumes do solvente de dispersão e de extração simultaneamente, de forma a obter um volume constante de fase inferior (Martins *et al.*, 2012; Viñas *et al.*, 2014). Por outro lado, o volume da fase inferior depende da solubilidade do solvente de extração em água, do volume da solução de amostra, do volume do solvente de dispersão e do volume do solvente de extração (Rezaee *et al.*, 2006).

Uma vez que a DLLME utiliza solventes imiscíveis em água, a técnica preferida para a análise de extratos é a GC. No entanto, a análise por HPLC permite a análise de extratos

de analitos polares obtidos após extração por DLLME (Rezaee *et al.*, 2010; Zgoła-Grzeškowiak e Grzeškowiak, 2011).

Para analitos polares e não-voláteis, inadequados à análise direta por GC, a etapa de derivatização é necessária de forma a aumentar a volatilidade do analito. A técnica de DLLME acoplada à derivatização permite a extração e derivatização numa única etapa, o que simplifica os passos de operação e reduz o tempo de análise (Rezaee *et al.*, 2010). Em 2012, um método de microextração e derivatização simultânea foi desenvolvida por Almeida *et al.* para a determinação de aminas biogénicas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas em cerveja. Uma mistura de acetonitrilo (solvente de dispersão), tolueno (solvente de extração) e cloroformato de isobutilo (reagente de derivatização) foi usada como reagente de extração/derivatização. Os extratos obtidos foram quantificados por GC-MS.

2.9 Derivatização de aminas

Os métodos usados na determinação das AB baseiam-se na ação de um reagente derivatizante, uma vez que as AB são compostos que requerem uma etapa de derivatização para serem analisados por HPLC ou por GC devido à falta de cromóforos e à baixa volatilidade das AB, respetivamente (Önal, 2007).

A derivatização analítica é utilizada de forma a permitir a análise de compostos com volatilidade ou estabilidade inadequada e para melhorar o comportamento cromatográfico ou deteção dos analitos. O objetivo da derivatização é a modificação química de um composto, derivatizando o seu grupo funcional (por exemplo, OH, COOH, NH₂ e SH) para permitir a sua análise cromatográfica. Assim, a derivatização pode aumentar a volatilidade e a estabilidade térmica, melhorar a seletividade e a deteção do analito (Fluka e SUPELCO, 2012).

Os processos de derivatização podem ser pré-coluna, na-coluna ou pós-coluna. A derivatização pós-coluna é uma abordagem comum em cromatografia líquida em que a derivatização ocorre após a separação dos analitos na coluna, os quais são convertidos em derivados mais propícios à deteção. A derivatização pré-coluna e na-coluna são utilizadas em GC na medida em que a derivatização dos analitos é realizada antes da injeção dos componentes na coluna cromatográfica ou os analitos e os reagentes de derivatização são misturados e injetados em conjunto no sistema de GC e a reação de derivatização ocorre na porta de injeção. Assim, a derivatização pré-coluna é frequentemente mais usada do que a derivatização pós-coluna uma vez que esta exige meios técnicos mais dispendiosos (Farajzadeh *et al.*, 2014).

As reações de derivatização podem também ser realizadas antes, após ou simultaneamente com a extração. No modo pré-extração, a reação de derivatização ocorre

antes dos analitos serem extraídos para uma outra fase. No modo de pós-extração, os analitos são convertidos após a extração em formas que são compatíveis com as abordagens posteriores para separação e detecção. No modo simultâneo, a extração e derivatização ocorrerá em uma única etapa, o que aumenta a recuperação do analito, melhora as características de separação e detecção (Farajzadeh *et al.*, 2014).

2.9.1 Reagentes de derivatização para Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida constitui atualmente a técnica de análise mais utilizada na quantificação de aminas biogénicas, uma vez que apesar da técnica de GC apresentar maior resolução e sensibilidade, a técnica de HPLC distingue-se pela facilidade de execução (Prete *et al.*, 2009; Önal, 2007).

Os agentes derivatizantes mais usados em HPLC caracterizam-se pela sua capacidade de reagir quantitativamente e de forma rápida com as aminas e formarem derivados fluorescentes ou derivados aos quais é possível a sua detecção por espectrofotometria de UV/Vis. Dessa forma, é possível obter elevada seletividade e sensibilidade na análise. Existem diversas substâncias que podem ser usadas como reagentes de derivatização em HPLC, cada uma com características específicas dos quais se destacam o ortoftaldialdeído (OPA), os cloretos de sulfonilo, os cloretos de carbonilo (cloroformatos) e a fluoescamina (Fernandes, 2001).

O ortoftaldialdeído (OPA) é um composto que não apresenta propriedades fluorescentes intrínsecas no entanto, ao reagir rapidamente com aminas primárias na presença de um redutor (2-mercaptoetanol) dá origem a um derivado altamente fluorescente que aumenta a seletividade do método (Gerbaux *et al.*, 1997), no entanto os derivados formados não são muito estáveis (Önal, 2007).

Os cloretos de sulfonilo (cloretos de ácidos sulfónicos) constituem um grupo de compostos com características eletrofílicas bastante utilizados em química analítica pela sua capacidade de reagir facilmente com aminas primárias e secundárias. O mais conhecido é o cloreto de dansilo (cloreto de 5-dimetilamino-1-naftaleno-sulfonilo), reagente mais comum usado na derivatização de aminas. Este, permite a formação de derivados de sulfonamida altamente fluorescentes e relativamente estáveis, que melhoram as propriedades cromatográficas e são facilmente isolados por extração com solvente (Anli e Bayram, 2009). Além disso, tem a vantagem de poder ser detetado por UV (Önal, 2007). No entanto, este composto apresenta desvantagens pois é capaz de reagir, embora de forma mais lenta do que reage com aminas, com compostos que possuam funções fenólicas e alcoólicas, conduzindo à presença de inúmeros picos adicionais nos cromatogramas obtidos após análise (Fernandes, 2001).

Os cloretos de ácidos carboxílicos ou cloretos de carbonilo constituem outro grupo de reagentes propostos como alternativa para a introdução de um grupo fluorogénico nas aminas biogénicas previamente à sua análise por cromatografia líquida. De entre eles destacam-se os cloroformatos, compostos altamente reativos na presença de aminas primárias e secundárias, também usados na derivatização de aminas para a sua análise por cromatografia gasosa (Fernandes, 2001).

O reagente fluorescamina (4-fenilspiro[furan-2-(3H),1'-ftalan]-3,3'-diona) foi introduzido em 1972 por Weigele *et al.* e reage facilmente com aminas primárias dando origem a derivados altamente fluorescentes.

2.9.2 Reações de derivatização para Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa não é aplicada frequentemente na quantificação de aminas biogénicas devido ao seu carácter intensamente polar (Önal, 2007). Essa característica, associada ao facto de a maioria deste tipo de compostos apresentar reduzida volatilidade, torna a sua análise direta extremamente difícil, ou até mesmo impossível, de realizar. Fenómenos de adsorção e decomposição dos compostos no interior do sistema cromatográfico, com perda, por vezes, da totalidade da substância injetada, e o aparecimento de picos cromatográficos mal definidos e com problemas de "tailing" são frequentes nesse tipo de análise. O problema é resolvido pelo recurso à derivatização dos compostos com um reagente apropriado, capaz não só de diminuir a polaridade das aminas, como também de aumentar a sua volatilidade e de proporcionar a sua deteção numa forma mais sensível e com maior seletividade. No entanto, as reações de derivatização são muitas vezes demoradas e bastante exigentes no que respeita às condições reacionais requeridas (por exemplo, ausência de água), o que serve de atenuante à pouca utilização desta técnica na análise de aminas em matrizes alimentares (Fernandes, 2001).

A maioria das reações de derivatização de aminas vulgarmente aplicadas em cromatografia gasosa é classificada em dois tipos: acilação e silição (Fluka e SUPELCO, 2012). No entanto, outras reações são aplicadas como, a formação de base de Schiff e a formação de carbamatos.

2.9.2.1 Acilação

A acilação é um dos processos mais conhecidos para a derivatização de aminas primárias e secundárias, e posterior análise por GC (Kataoka, 2005). Esta reação consiste na introdução de um grupo acilo numa molécula com um átomo de hidrogénio reativo. Uma das vantagens da acilação como técnica de derivatização de aminas é o facto de a reação ocorrer facilmente em condições suaves (Farajzadeh *et al.*, 2014). A acilação apresenta

assim benefícios na análise por GC como o aumento da estabilidade do analito e o fornecimento de volatilidade em substâncias com vários grupos polares que são normalmente não voláteis e se decompõem com o calor. Além disso, os derivados acilados tendem a produzir padrões de fragmentação de compostos em aplicações por espectrometria de massa, de fácil interpretação e que fornecem informações úteis sobre a estrutura dos compostos (Orata, 2012).

A acilação é uma alternativa à sililação, sendo preferível nos casos em que os derivados acilados são mais estáveis do que os sililados, como é caso das aminas primárias (Blau e Halket, 1993).

Os reagentes de acilação dividem-se em três tipos: anidridos ácidos, haletos de acilo e acilimidazóis (Farajzadeh *et al.*, 2014). A escolha de anidridos (como anidrido trifluoroacético e anidrido heptafluorobutírico) para o processo de derivatização baseia-se no facto de serem muito reativos e possuírem maior volatilidade, facilitando a sua remoção no final do processo reativo (Fernandes e Ferreira, 2000). Os haletos de acilo são muito reativos, sendo os escolhidos no caso de moléculas difíceis de acilar por impedimentos estéricos. No entanto, o excesso de derivatizante deve ser removido, o que implica um processo extrativo no final da derivatização (Kataoka, 1996).

O acetilimidazol e outros reagentes acilantes com grupos doadores de natureza básica são os escolhidos quando se trata de moléculas que se degradam em meio ácido (Kataoka, 1996).

2.9.2.2 Sililação

A reação de sililação consiste na substituição de um hidrogénio reativo presente num grupo polar por um grupo alquilsilil, como trimetilsilil (TMS) ou *t*-butildimetilsilil (*t*-BDMS) (Farajzadeh *et al.*, 2014).

Os reagentes de sililação mais utilizados são o trimetilclorosilano (TMCS), trimetilsililimidazol (TMSIM), hexametildissilazano (HDMS), N,O-Bis-TMS-acetamida (BSA), N,O-Bis-TMS-trifluoroacetamida (BSTFA) e N-Metil-N-TMS-trifluoroacetamida (MSTFA). Todos os reagentes de sililação e seus derivados são sensíveis à humidade, de modo que as reações de sililação são mais eficazes em condições anidras e os reagentes de sililação devem ser armazenados em recipientes hermeticamente fechados (Farajzadeh *et al.*, 2014; Orata, 2012). Assim, a escolha do reagente de sililação propende da reatividade e seletividade para com o composto, da aplicação a que se destina, da estabilidade do derivado formado e da abundância/natureza dos produtos derivados da reação (Fluka e SUPELCO, 2012).

Nesta reação, as aminas primárias reagem mais facilmente do que as aminas secundárias e terciárias devido ao menor impedimento estérico (Farajzadeh *et al.*, 2014).

No entanto, o grupo amina não é muito reativo com reagentes de silição e a sua derivatização é difícil, o que requer a utilização de reagentes de silição mais fortes e a presença de catalisadores (Kataoka, 1996), os quais dependem do reagente de silição utilizado na reação (Blau e Halket, 1993). O catalisador mais comumente utilizado é o TMCS, um reagente de silição raramente utilizado sozinho em aplicações analíticas, sendo aplicado em misturas, como por exemplo HMDS/TMCS/piridina ou BSA/TMSIM/TMCS (Blau e Halket, 1993). Outros catalisadores utilizados são o ácido clorídrico, o ácido trifluoroacético, o acetato de potássio e a piridina (Blau e Halket, 1993).

A silição constitui um dos métodos mais populares de derivatização de compostos previamente à sua análise por GC uma vez que, os derivados formados são mais voláteis, menos polares e termicamente mais estáveis (Fluka e SUPELCO, 2012). Além disso, possuem melhores propriedades de deteção por espectrometria de massa, produzindo padrões de fragmentação mais favoráveis para a investigação de estruturas e iões específicos de massa elevada, derivados dos iões moleculares. Desta forma, podem ser utilizados em análise de vestígios em modo de monitorização seletiva de iões (SIM) (Farajzadeh *et al.*, 2014).

A maioria dos reagentes exige o aquecimento não superior a 60°C durante cerca de 10-15 minutos, para evitar a degradação do derivado. No entanto, compostos com elevado impedimento estérico, podem exigir mais tempo de aquecimento (Orata, 2012).

2.9.2.3 Formação de base de Schiff

Reações que levam à formação de bases de Schiff podem ser realizadas rapidamente numa solução aquosa à temperatura ambiente, utilizando uma variedade de aldeídos e cetonas. Estes reagentes carbonílicos são seletivos para aminas primárias e os derivados produzidos têm boas características para análise por CG (Kataoka, 1996).

A acetona, a ciclo-hexanona, a ciclo-heptanona, o aldeído 2-tiofeno, o pentafluorobenzaldeído (PFB) e a N,N-dimetilformamida dimetil acetal foram utilizados como agentes de formação de bases de Schiff. A derivatização com PFB é frequentemente preferível devido à superior seletividade e sensibilidade (Farajzadeh *et al.*, 2014).

2.9.2.4 Formação de carbamatos

A formação de carbamatos é um dos métodos mais atraentes utilizados na derivatização de aminas para a análise de GC. A reação de derivatização inclui a adição de um grupo alquilo ao átomo de azoto da amina e é aplicada a aminas primárias, secundárias e terciárias (Farajzadeh *et al.*, 2014; Kataoka, 1996).

Os reagentes utilizados para esta finalidade são o grupo dos cloroformatos de alquilo ao qual pertencem o cloroformato de etilo, de isobutilo, de amilo e de pentafluorobenzilo

(Kataoka, 1996). Os cloroformatos de alquilo são menos reativos com água do que os reagentes de acilação e siliilação. A reação de aminas com cloroformatos de alquilo é rápida e pode ser facilmente realizada em poucos minutos, à temperatura ambiente, em meio alcalino aquoso, e os derivados de carbamatos resultantes possuem boas propriedades para análise por GC. No entanto, estes reagentes, em condições anidras, podem igualmente reagir com grupos álcool, fenol, tiol e imidazol (Kataoka, 2005).

Segundo Almeida *et al.* (2012), o cloroformato de etilo e de isobutilo têm igualmente características muito favoráveis à determinação de compostos amina por GC pois convertem fácil e quantitativamente aminas em carbamatos com boas propriedades cromatográficas.

PARTE EXPERIMENTAL

Objetivos da Parte Experimental

O principal objetivo desta dissertação foi a detecção e quantificação de 18 aminas biogénicas em amostras de licores, através da validação de um método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

Especificamente os objetivos são:

- Validação de um método analítico baseado na extração e derivatização simultânea de AB em amostras de licores seguida pela análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.
- Detecção e quantificação de aminas biogénicas em amostras caseiras e amostras comerciais de licores e em licores à base de café, de ervas, de frutas, de leite e de mel.
- Avaliação da possível existência de diferenças significativas nos teores de aminas biogénicas presentes nos licores comerciais e nos caseiros, bem como nos licores à base de café, de ervas, de frutas, de leite e de mel.

3. Delineamento Experimental

3.1 Materiais

3.1.1 Amostragem

3.1.2 Reagentes

3.1.2.1 Padrões de aminas

3.1.2.2 Padrões internos

3.1.2.3 Solventes

3.1.2.4 Gases

3.1.3 Equipamentos

3.1.3.1 Sistema GC-MS

3.1.3.2 Outros equipamentos

3.1.3.3 Consumíveis

3.2 Procedimento analítico

3.2.1 Processo de extração e derivatização

3.2.2 Condições cromatográficas

3.3 Identificação e quantificação

3.4 Tratamento estatístico

Neste capítulo apresenta-se a descrição da amostragem, dos reagentes e dos equipamentos utilizados, bem como o procedimento analítico aplicado, as condições cromatográficas e a análise estatística usada no tratamento dos resultados obtidos.

3.1 Materiais

3.1.1 Amostragem

No presente estudo foram analisadas um total de 27 amostras de licores, das quais 12 comerciais e 15 de fabrico caseiro. As amostras obtidas foram numeradas do número 1 ao 27, o qual foi precedido da letra C para as amostras comerciais e da letra H para as amostras caseiras. Todas as amostras foram armazenadas, até ao momento de análise, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

As amostras foram agrupadas quanto ao tipo de licor em cinco grupos designadamente: i) à base de café, ii) à base de ervas, iii) à base de frutas, iv) à base de leite e v) à base de mel, e quanto ao modo de produção, em comerciais e caseiros. Na Tabela 3.1 estão representadas todas as amostras analisadas, na qual constam o tipo de licor, a designação, as principais matérias-primas descritas no rótulo, o modo de produção e o teor alcoólico mencionado no rótulo das amostras comerciais.

Tabela 3.1. Classificação dos licores quanto ao tipo: à base de café, à base de ervas, à base de frutas, à base de leite e à base de mel, principais matérias-primas descritas no rótulo, modo de produção e teor alcoólico das amostras comerciais.

Licores à base	Designação	Matérias-primas (descritas no rótulo)	Modo de produção	Teor alcoólico (%)
Café	H4	Café e leite	Caseiro	---
	H6	Café	Caseiro	---
	H10	Café	Caseiro	---
	C21	Café	Comercial	18
	C23	Café	Comercial	33
Ervas	C3	Menta	Comercial	21
	C5	Plantas e sementes aromáticas	Comercial	22
	C11	Ervas, especiarias	Comercial	40
	H16	Funcho	Caseiro	---
	H17	Camélia	Caseiro	---
	H18	Ervas aromáticas	Caseiro	---
	H19	Eucalipto	Caseiro	---
	H22	Canela	Caseiro	---

Tabela 3.1. (cont.)

Licores à base	Designação	Matérias-primas (descritas no rótulo)	Modo de produção	Teor alcoólico (%)
Frutas	C1	Laranja	Comercial	40
	C2	Mirtilo	Comercial	30
	C9	Jenipapo	Comercial	25
	C12	Maracujá	Comercial	24
	H13	Tangerina	Caseiro	---
	H15	Ginja	Caseiro	---
	H20	Cereja	Caseiro	---
	H24	Noz	Caseiro	---
	C25	Ginja	Comercial	19
	H26	Uva	Caseiro	---
C27	Ginja	Comercial	20	
Leite	C14	Leite, baunilha, cacau e canela	Comercial	20
Mel	H7	Mel	Caseiro	---
	H8	Mel	Caseiro	---

3.1.2 Reagentes

3.1.2.1 Padrões de aminas

Para realização dos ensaios experimentais utilizaram-se padrões de aminas majoritariamente na forma de sais hidrocloreto, obtidos a partir da Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos), Aldrich (Milwaukee, WI, Estados Unidos) e da Fluka (Buchs, Suíça): metilamina, dimetilamina, etilamina, isopropilamina, dietilamina, isobutilamina, 2-metilbutilamina, pirrolidina, isoamilamina, morfolina, piperidina, amilamina, 2-feniletilamina, 1,3-diaminopropano, putrescina, cadaverina, histamina e tiramina, todos com um grau de pureza superior a 98%.

De cada substância prepararam-se soluções a 2 g/L em HCl 0,1M por pesagem e dissolução, de forma a conferir estabilidade à solução, as quais foram armazenadas a 4°C. No momento da análise, foram preparadas soluções diluídas, de concentração adequada.

3.1.2.2 Padrões internos

Os padrões internos (PI) deuterados metil[²H₃]amina.HCl, etil[²H₅]amina.HCl, 2,2,3,3,4,4,5,5-[²H₈]pirrolidina, [²H₈]putrescina.2HCl e α,α,β,β-[²H₄]histamina.2HCl foram obtidos por CDN isótopos (Quebec, Canadá) através da Regie (Montlugon, França), todos

com um grau de pureza superior a 98%. Os padrões internos, anfetamina e hidroxianfetamina foram obtidos à Sigma, com um grau de pureza superior a 98%.

De cada padrão interno, prepararam-se soluções a 2 g/L em HCl 0,1M por pesagem e dissolução, as quais foram armazenadas a 4°C. No momento da análise, foram preparadas soluções diluídas, de concentração adequada.

3.1.2.3 Solventes

O hidróxido de sódio (NaOH) 10M foi obtido à Fluka Analytical, o qual foi diluído com água ultra-pura de forma a obter soluções de concentração 2M e 5M. O ácido clorídrico (HCl) 32% (m/m) foi obtido à Sigma-Aldrich, tendo sido diluído em água ultra-pura de forma a obter uma solução 0,1M.

A solução tampão pH 12 (a 20°C) foi obtida à Sigma-Aldrich.

O reagente de derivatização, cloroformato de isobutilo (IBCF), foi obtido na Fluka com um grau de pureza superior a 98%. O tolueno foi obtido pela Merck (Darmstadt, Alemanha) e o acetonitrilo foi obtido pela Sigma-Aldrich, ambos com um grau de pureza superior a 99,9%.

A solução de metanol alcalino foi preparada por dissolução de hidróxido de potássio (KOH) (obtido pela Prolabo, Lovaina - Bélgica) com um grau de pureza de 86,1%, em metanol (obtido pela Sigma-Aldrich) com pureza superior a 99,9%, até dissolução completa do sal.

A água ultra-pura utilizada na preparação das soluções de trabalho foi obtida através de um sistema Milli-Q System (Estados Unidos).

3.1.2.4 Gases

Como gás de arraste no processo de cromatografia gasosa utilizou-se hélio N60, que corresponde ao mais alto grau de pureza deste gás que se encontra comercialmente disponível: 99,9999%. Para a evaporação das amostras usou-se azoto N55, com um grau de pureza de 99,9995%. Ambos os gases foram fornecidos pela Air Liquide (Maia, Portugal).

3.1.3 Equipamentos

3.1.3.1 Sistema GC-MS

Na execução deste trabalho utilizou-se um aparelho de GC-MS da marca Agilent Technologies, modelo 6890N da Network GC System, equipado com uma porta de injeção "split/splitless", ao qual está associado um detetor seletivo de massa, da marca Agilent Technologies, modelo 5975 (Agilent, Palo Alto, CA, Estados Unidos) com câmara de ionização por impacto de eletrões.

A separação foi realizada numa coluna capilar DB-5MS apolar composta por 5% fenil e 95% metilpolisiloxano (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) da J&W Scientific (Folsom, CA, Estados Unidos). O gás de arraste utilizado foi o hélio, com fluxo constante de 1 mL/min. A injeção foi efetuada em modo automático (injetor Combi Pal) com um volume de injeção de 1 µL (em modo de “splitless”, pulso de pressão 32 psi, 1 minuto) com o injetor à temperatura de 280°C.

Os parâmetros de deteção por espectrometria de massa foram definidos da seguinte forma: a energia de ionização de impacto dos eletrões foi de 70 eV, a temperatura da fonte de iões foi de 230°C e a temperatura do quadrupolo MS foi de 150°C.

3.1.3.2 Outros equipamentos

A agitação mecânica dos extratos foi efetuada num vortéx da marca Velp Scientifica (Usmate, Itália), modelo Wizard Advanced com modo de deteção por infravermelhos.

As centrifugações foram executadas numa centrífuga da marca Heraeus Sepatech (Osterode, Alemanha), modelo Labofuge Ae com um máximo de 5000 rpm (rotações por minuto).

A evaporação de solventes em corrente de azoto foi realizada num aparelho da marca Stuart (ST15 OSA, Reino Unido), modelo SBH200D/3, digital e com bloco de aquecimento até 200°C.

3.1.3.3 Consumíveis

As amostras foram armazenadas em frascos de vidro âmbar de 22 mL com tampa de rosca de plástico revestidas internamente com Teflon® Politetrafluoretileno (PTFE) (Supelco, Bellefonte, PA, Estados Unidos).

As reações de extração e derivatização das amostras e dos padrões para a curva de calibração foram realizadas em frascos de vidro silanizado de 15 mL com tampa de rosca de plástico revestidas internamente com Teflon® PTFE (Supelco, Bellefonte, PA, Estados Unidos).

Os extratos finais obtidos após extração e derivatização das amostras foram armazenados em frascos de vidro silanizado de 2 mL com tampa de rosca de plástico revestidas internamente com Teflon® PTFE (Supelco, Bellefonte, PA, Estados Unidos).

Para a injeção dos extratos no cromatógrafo gasoso utilizou-se uma seringa da marca Hamilton® (Bonaduz, Suíça), modelo 701N, de 10 µL de volume total, com uma agulha de 70 mm de comprimento e ponta em forma de bisel de aço inoxidável.

Os “liners”, “septos” e outros consumíveis usados no injetor do cromatógrafo gasoso foram adquiridos à Agilent.

3.2 Procedimento analítico

3.2.1 Processo de extração e derivatização

O processo de extração e derivatização simultânea foi otimizado e validado com base no método de extração DLLME previamente otimizado para a análise de aminas biogénicas em cervejas (Almeida *et al.*, 2012).

Mediu-se uma alíquota de 5,0 mL de amostra para um frasco de vidro de 15 mL e adicionaram-se 50 µL de uma solução em HCl 0,1M contendo os 7 padrões internos a 20 mg/L.

A mistura foi alcalinizada com NaOH 2M até pH 12 e tamponada com tampão fosfato 0,5M, até um volume total de adição de 1 mL. De seguida uma mistura de acetonitrilo (1 mL), tolueno (325 µL) e clorofornato de isobutilo (25 µL), foi rapidamente injetada no frasco da amostra. O frasco foi devidamente fechado e agitado manualmente durante 3 minutos. Centrifugou-se a 3200 g durante 2 minutos. A fase toluénica (fase superior) obtida foi dividida em duas porções:

- a) Uma porção da fase toluénica (150 µL) foi transferida para um frasco de 4 mL, à qual foi adicionado 75 µL de metanol alcalino. Agitou-se manualmente o tubo durante 1 minuto, adicionou-se 450 µL de NaOH 5M e voltou a agitar-se manualmente durante 1 minuto. Centrifugou-se a 3200 g durante 2 minutos e a fase toluénica foi usada para a determinação de todas as aminas, exceto a tiramina e a histamina.
- b) Uma segunda porção da fase toluénica (50 µL) foi transferida para outro frasco de 4 mL e evaporada à secura sob uma ligeira corrente de azoto. O resíduo seco foi redissolvido em 25 µL de tolueno e a solução foi usada para análise da tiramina e histamina.

3.2.2 Condições cromatográficas

O programa de temperaturas utilizado no cromatógrafo foi: temperatura inicial 85°C, mantida durante 1,2 minutos; aumento de 10°C/minuto, até 160°C; aumento de 25°C/minuto, até 280°C a qual se mantém durante 6,5 minutos. O tempo total da corrida foi de 20 minutos (Figura 3.1).

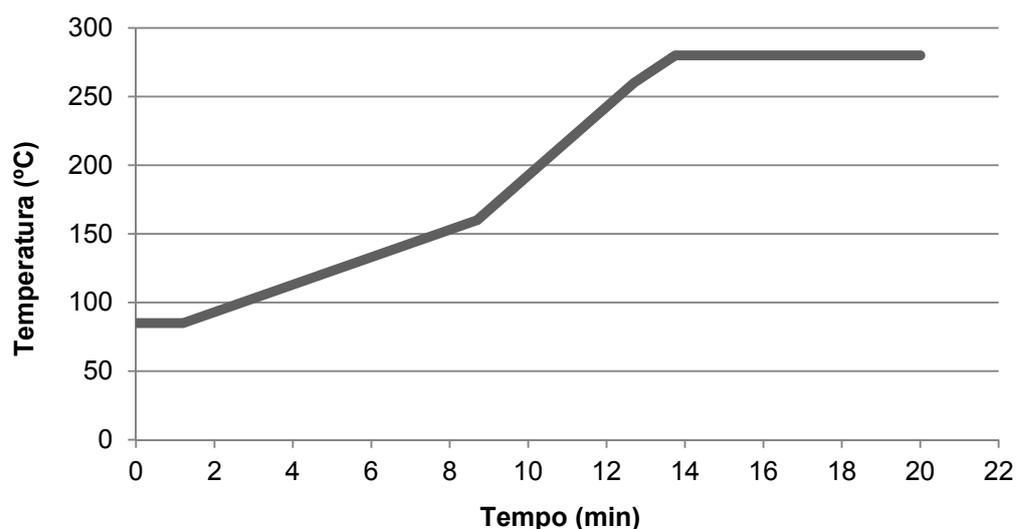


Figura 3.1. Gráfico da rampa de temperatura de análise por GC-MS.

De forma a estabelecer o tempo de retenção de cada composto e a obter o respetivo espectro de massa, a aquisição de dados foi efetuada em modo de varrimento contínuo, numa gama de massas de m/z 50 a m/z 700.

Uma vez estabelecidas as condições de separação cromatográfica, e tendo como objetivo a quantificação dos compostos em análise, a aquisição dos resultados foi efetuada em modo de monitorização seletiva de iões (SIM), tendo-se usado 11 grupos diferentes de iões diferenciados no tempo, de acordo com a Tabela 3.2. A seleção dos iões a monitorizar foi feita em função da respetiva abundância no espectro de massa dos compostos em estudo e da sua especificidade, num mínimo de 3 iões para cada composto.

O sistema ChemStation foi o software utilizado para recolha de dados e para controlo e processamento do aparelho de GC-MS.

Tabela 3.2. Condições para a quantificação de aminas biogênicas por GC-MS em modo de monitorização seletiva de íões (SIM).

Injeção	Compostos	Tempo início janela (min)	t _R (min) ^a	m/z íões SIM (% de abundância relativa) ^b	
1 ^a	Metilamina[² H ₃] (PI)	1,7	2,47	79 (92), 61 (100)	
	Metilamina		2,48	76 (100), 58 (99), 88 (7)	
	Dimetilamina		2,55	72 (86), 90 (99), 145 (2)	
	Etilamina[² H ₅] (PI)	2,7	2,98	95 (100), 77 (78)	
			Etilamina	3,02	90 (100), 72 (76), 130 (4), 118 (24)
			Isopropilamina	3,25	144 (100), 86 (59), 104 (65)
	Dietilamina	3,5	3,75	118 (58), 100 (83), 102 (90), 158 (39)	
			Isobutilamina	4,0	130 (63), 130 (34), 100 (11), 173 (9)
	Pirrolidina [² H ₈] (PI)	4,9	5,66	106 (50), 124 (100)	
			Pirrolidina	5,7	98 (53), 114 (89), 116 (166)
			2-Metilbutilamina	5,81	187 (89), 158 (42), 114 (10), 132 (31)
			Isoamilamina	6,04	132 (56), 114 (17), 130 (56), 88 (25)
Morfolina	6,15	6,31	116 (48), 114 (42), 130 (34), 70 (12)		
		Piperidina	6,4	128 (100), 112 (30), 130 (49)	
		Amilamina	6,51	132 (99), 114 (38), 130 (86), 71 (47)	
Anfetamina (PI)	8,3	10,09	144 (100), 162 (5), 91 (63)		
		2-Feniletilamina	10,11	221 (100), 130 (35), 91 (59), 104 (70)	
1,3-Diaminopropano	10,5	11,62	101 (86), 144 (39), 201 (21), 274 (7)		
Putrescina[² H ₈] (PI)	11,85	12,14	176 (36), 296 (9)		
		Putrescina	12,17	170 (71), 130 (46), 288 (8)	
Cadaverina	12,32	12,56	130 (76), 84 (78), 129 (72), 302 (16)		
2 ^a	Histamina[² H ₄] (PI)	1,7	12,81	197 (65), 242 (7), 128 (15)	
	Histamina		12,88	194 (93), 238 (9), 138 (22)	
	Hidroxianfetamina (PI)		13,18	144 (100), 107 (20)	
	Tiramina		13,29	120 (100), 107 (55), 176 (12), 237 (5)	

^at_R corresponde ao tempo de retenção de cada composto.

^bO íão apresentado a **negrito** corresponde ao íão de quantificação. Os restantes íões apresentados são de confirmação.

3.3 Identificação e quantificação

Para a identificação das aminas verificou-se as abundâncias relativas dos íões de quantificação e de confirmação e o tempo de retenção característico do padrão de calibração.

Para a sua quantificação, construíram-se curvas de calibração a partir de soluções padrão de aminas em água ultra-pura, com 8 níveis de concentração. Para tal, foram preparadas soluções intermédias, por dissolução da solução mãe de 2 g/L em HCl 0,1M (contendo todas as substâncias de interesse), com concentração de 100 mg/L e 10 mg/L. Por diluição das soluções intermédias em água ultra-pura prepararam-se soluções padrão de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 mg/L num volume total de 5 mL de solução. As soluções padrão foram sujeitas a um tratamento rigorosamente igual às amostras.

Os padrões internos utilizados foram escolhidos rigorosamente para que tivessem um comportamento extrativo e cromatográfico análogo às aminas biogénicas analisadas. Desta forma, foram usados 7 padrões internos: metil[²H₃]amina.HCl, etil[²H₅]amina.HCl, 2,2,3,3,4,4,5,5-[²H₈]pirrolidina, [²H₈]putrescina.2HCl, α,α,β,β-[²H₄]histamina.2HCl, anfetamina e hidroxianfetamina, os quais foram utilizados na quantificação das diferentes aminas analisada, de acordo com a Tabela 3.3. A maioria dos PI está na forma deuterada, a qual tem a mesma ionização e dessorção de fragmentação característica do composto respetivo.

Tabela 3.3. Padrões internos e respetivas aminas utilizados na quantificação das diferentes aminas biogénicas.

Padrão interno	Aminas
Metil[² H ₃]amina.HCl	Metilamina e Dimetilamina
Etil[² H ₅]amina.HCl	Etilamina, Isopropilamina, Dietilamina e Isobutilamina
2,2,3,3,4,4,5,5-[² H ₈]Pirrolidina	Pirrolidina, Morfolina e Piperidina
[² H ₈]Putrescina.2HCl	2-Metilbutilamina, Isoamilamina, Amilamina, 1,3-Diaminopropano, Putrescina e Cadaverina
Anfetamina	2-Feniletilamina
α,α,β,β-[² H ₄]Histamina.2HCl	Histamina
Hidroxianfetamina	Tiramina

A determinação da quantidade de cada amina nas amostras analisadas foi concretizada através da interpolação da relação área do pico da amina/área pico do padrão interno na equação da reta de calibração respectiva. Foram construídas diversas curvas de calibração para cada amina estudada (três no mínimo) que foram interpoladas na sequência de injeções das amostras analisadas.

3.4 Tratamento estatístico

Os resultados obtidos foram sujeitos a tratamento estatístico utilizando o programa IBM SPSS Statistics versão 20 para Windows (SPSS, Chicago IL, USA).

A análise estatística envolveu inicialmente um “Explore” dos dados analíticos para verificar a homogeneidade de variância e a normalidade entre os resultados. Uma vez que tal não se verificou, optou-se pela aplicação do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis de forma a verificar se existem diferenças significativas entre as amostras caseiras e comerciais, e entre os licores à base de café, de ervas, de frutas, de leite e de mel; e o teste Mann-Whitney U para comparação múltipla 2 a 2 entre os modos e entre os tipos de licores.

4. Resultados e Discussão

4.1 Validação do método analítico

4.1.1 Linearidade

4.1.2 Repetibilidade intra-dia e inter-dia

4.1.3 Ensaio de recuperação

4.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação

4.2 Perfil de aminas biogénicas em amostras de licores

4.2.1 Resultados

4.2.2 Discussão dos resultados

4.2.2.1 Análise individual das aminas

4.2.2.2 Análise por modos de produção

4.2.2.3 Análise por tipos de licores

4.1 Validação do método analítico

A validação de um método analítico tem como objetivo a avaliação da sua eficácia e eficiência, o controlo das variáveis que afetam os resultados analíticos e a avaliação da incerteza global associada ao método. A validação é feita através da análise de parâmetros analíticos importantes como, linearidade, repetibilidade intra-dia e inter-dia, ensaios de recuperação e limites de deteção e de quantificação.

A otimização foi efetuada a partir do método proposto por Almeida *et al.* (2012) para a determinação de amins biogénicas em amostras de cerveja. O licor não é um produto obtido através de um processo fermentativo, no entanto no seu processo de fabrico podem ser incorporadas matérias-primas fermentadas e bebidas alcoólicas, passíveis de conterem amins biogénicas. Sendo o licor uma matriz distinta da cerveja foi efetuada a validação do método para esta matriz.

4.1.1 Linearidade

A linearidade define-se como a capacidade de um determinado método, dentro de uma gama determinada de concentrações, gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra.

Para a avaliação da linearidade do método foram construídas curvas de calibração em água-ultra pura com diferentes e conhecidos níveis de concentração das 18 amins biogénicas estudadas. O estudo da linearidade foi efetuado três vezes ao longo da análise das amostras, tendo ainda sido construídas novas curvas de calibração por cada série de ensaios de repetição das amostras, nos ensaios de recuperação e de precisão.

A linearidade do método foi verificada através de retas de calibração com 9 níveis de concentração (um dos quais o branco), numa gama de concentrações de 0 a 2,5 mg/L, para cada uma das amins em estudo. O intervalo de concentrações utilizado foi concordante com a quantidade de amins esperada nas amostras. As retas de calibração foram obtidas por regressão linear da relação da área do pico da amina/área do respetivo padrão interno, em função da concentração de cada amina separadamente.

Para todas as substâncias analisadas verificou-se uma estreita correlação entre a quantidade de cada amina e a resposta do detetor, o que se justifica com o indicador da linearidade da curva, o coeficiente de correlação (r). Este foi superior a 0,999 em todas as amins biogénicas estudadas (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Equação da reta de calibração obtida pela análise de 9 soluções padrão de cada uma das aminas estudadas e respetivo coeficiente de correlação (r) (padrões internos a 20 mg/L).

Aminas	Equação	Coeficiente de correlação (r)
Metilamina	$y = 2,3825x + 0,0606$	0,9997
Dimetilamina	$y = 2,5291x + 0,0154$	0,9997
Etilamina	$y = 5,7594x - 0,0101$	0,9992
Isopropilamina	$y = 1,5403x + 0,0108$	0,9997
Dietilamina	$y = 1,3971x - 0,0171$	0,9990
Isobutilamina	$y = 0,9048x + 0,0074$	0,9998
Pirrolidina	$y = 3,9866x - 0,0723$	0,9996
2-Metilbutilamina	$y = 3,6015x + 0,1414$	0,9993
Isoamilamina	$y = 4,3789x + 0,0156$	0,9993
Morfolina	$y = 5,7579x + 0,0337$	0,9996
Piperidina	$y = 9,0244x - 0,0239$	0,9999
Amilamina	$y = 5,4283x + 0,0145$	0,9997
2-Feniletilamina	$y = 0,3038x + 0,0008$	0,9998
1,3-Diaminopropano	$y = 4,8963x + 0,0377$	0,9996
Putrescina	$y = 4,6765x - 0,1045$	0,9993
Cadaverina	$y = 10,481x - 0,0181$	0,9994
Histamina	$y = 8,9412x - 0,0022$	0,9997
Tiramina	$y = 6,7758x - 0,0264$	0,9997

4.1.2 Repetibilidade intra-dia e inter-dia

De forma a avaliar a eficácia do método analítico, foram efetuados ensaios de repetibilidade intra-dia e inter-dia – precisão – grau de concordância dos resultados obtidos numa série de análises de uma mesma amostra. Para a determinação da repetibilidade intra-dia do método fizeram-se seis réplicas de uma amostra de licor caseiro (H22) e procedeu-se à análise conforme o descrito na secção 3.2.1. Após 40 dias foram avaliadas mais seis réplicas dessa mesma amostra para a determinação da repetibilidade inter-dia. Em ambos os casos procedeu-se à análise das seis réplicas em simultâneo com uma série

de padrões usados para a construção das curvas de calibração necessárias. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Resultados da repetibilidade intra-dia e inter-dia do método: média e desvio-padrão (SD) (mg/L), e coeficiente de variação expresso em porcentagem (%) de seis réplicas da amostra H22.

Aminas	Repetibilidade intra-dia			Repetibilidade inter-dia		
	Média (mg/L)	SD (mg/L)	CV (%)	Média (mg/L)	SD (mg/L)	CV (%)
Metilamina	0,07	0,0048	7	0,07	0,0052	8
Dimetilamina	0,04	0,0032	7	0,04	0,0035	8
Etilamina	0,01	0,0010	9	0,01	0,0011	10
Dietilamina	<LQ			<LQ		
Morfolina	0,67	0,0341	5	0,68	0,0459	7
Amilamina	0,09	0,0033	4	0,09	0,0032	4
1,3-Diaminopropano	0,07	0,0050	7	0,07	0,0056	8
Cadaverina	0,09	0,0062	7	0,09	0,0055	6
Tiramina	0,05	0,0023	5	0,04	0,0018	4
Histamina	0,17	0,0150	9	0,16	0,0172	11

n=6, CV=coeficiente de variação (%)

Pela análise da tabela acima apresentada pode observar-se, que à exceção da histamina, todas as aminas presentes na amostra H22 obtiveram um coeficiente de variação igual ou inferior a 10% nas duas determinações efetuadas, o que é bastante satisfatório neste tipo de análises.

4.1.3 Ensaio de recuperação

Para avaliar a eficiência do procedimento analítico foram igualmente efetuados ensaios de recuperação, que permitem avaliar a exatidão do método analítico. Para a avaliação deste parâmetro, uma amostra de licor comercial (C5) com uma quantidade conhecida de substância foi fortificada com três níveis de concentração de padrões conhecidos (0,025; 0,05 e 0,25 mg/L) (faixa de concentração esperada para os compostos de interesse), tendo o tratamento das amostras sido feito em triplicado e em paralelo com uma série de padrões usados para a curva de calibração.

As porcentagens de recuperação para cada amina biogénica em estudo foram calculadas comparando a diferença entre a amostra fortificada e a amostra não fortificada

num nível de concentração. Do mesmo modo, foram calculados os coeficientes de variação entre os triplicados analisados para cada um dos níveis de adição. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Resultados dos ensaios de recuperação do método e do coeficiente de variação dos triplicados analisados para cada nível de adição (0,025; 0,05 e 0,25 mg/L) numa amostra de licor comercial (C5), ambos expressos em percentagem (%).

Aminas	Nível (mg/L)	Recuperação (%)	CV (%)
Metilamina	0,025	95	3
	0,05	97	2
	0,25	96	5
Dimetilamina	0,025	92	2
	0,05	89	4
	0,25	96	3
Etilamina	0,025	95	2
	0,05	93	4
	0,25	103	2
Isopropilamina	0,025	98	1
	0,05	95	2
	0,25	98	2
Dietilamina	0,025	96	2
	0,05	83	5
	0,25	95	4
Isobutilamina	0,025	94	4
	0,05	81	4
	0,25	95	4
Pirrolidina	0,025	98	2
	0,05	97	2
	0,25	99	2
2-Metilbutilamina	0,025	96	1
	0,05	87	3
	0,25	98	2
Isoamilamina	0,025	89	5
	0,05	88	3
	0,25	96	3
Morfolina	0,025	91	1
	0,05	98	2
	0,25	96	2

Tabela 4.3. (cont.)

Aminas	Nível (mg/L)	Recuperação (%)	CV (%)
Piperidina	0,025	99	1
	0,05	99	2
	0,25	100	1
Amilamina	0,025	95	2
	0,05	91	4
	0,25	98	2
2-Feniletilamina	0,025	94	2
	0,05	90	1
	0,25	96	1
1,3-Diaminopropano	0,025	94	2
	0,05	85	3
	0,25	95	4
Putrescina	0,025	108	4
	0,05	104	4
	0,25	100	2
Cadaverina	0,025	96	2
	0,05	87	5
	0,25	94	5
Histamina	0,025	90	5
	0,05	79	2
	0,25	90	5
Tiramina	0,025	102	3
	0,05	107	2
	0,25	100	3

$n=3$, CV=coeficiente de variação (%)

Pela análise da Tabela 4.3 constata-se que, os valores de recuperação variaram entre 79 e 108% nas 18 aminas biogénicas analisadas. A histamina é a amina que possui menor percentagem média de recuperação (87%), enquanto a piperidina obteve a maior média de recuperação (99%). A putrescina e a tiramina apresentaram médias de recuperação ligeiramente superiores a 100%, respetivamente, 104% e 103%, o que pode indicar um efeito da matriz, dado que as soluções padrão utilizadas na construção das curvas de calibração foram preparadas em água ultra-pura e não em extratos de matriz.

Geralmente a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração adicionada à amostra. No entanto, tal facto não se verifica em todas as aminas analisadas pois na maioria dos casos a concentração de 0,05 mg/L obteve maior CV (%) do que a concentração de 0,025 mg/L.

4.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada. Após três leituras da linha de base de uma amostra diluída foi estabelecido um limite de detecção de 0,004 mg/L para todas as aminas analisadas.

O limite de quantificação (LQ) define-se pela menor quantidade de analito numa amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (coeficientes de variação <20%), em condições analíticas idênticas às utilizadas nas amostras. Foram efetuadas dez leituras da linha de base de amostras diluídas com baixas concentrações conhecidas dos analitos comparativamente com o branco e foi estabelecido um limite de quantificação de 0,01 mg/L, como a concentração mínima na qual as aminas podem ser quantificadas.

4.2 Perfil de aminas biogénicas em amostras de licores

4.2.1 Resultados

A validade do método foi avaliada pela análise de vinte e sete amostras de licores, das quais doze adquiridas comercialmente e quinze de fabrico caseiro. Nas Tabelas 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8 estão apresentados os resultados das aminas biogénicas primárias, secundárias, diaminas, N-heterocíclicas e aromáticas, respetivamente, para as amostras caseiras e comerciais. O teor de aminas biogénicas está expresso em concentração (mg/L), sendo este o valor médio obtido de três leituras de cada uma das amostras analisadas.

Da observação total das tabelas acima enumeradas verifica-se que foram detetadas 18 aminas (metilamina, etilamina, isopropilamina, isobutilamina, 2-metilbutilamina, isoamilamina, amilamina, dimetilamina, dietilamina, 1,3-diaminopropano, putrescina, cadaverina, pirrolidina, morfolina, piperidina, histamina, 2-feniletilamina e tiramina) nas amostras caseiras e 15 aminas (todas as anteriores exceto isobutilamina, 2-metilbutilamina e isoamilamina) nas amostras comerciais de licor.

Analisando os resultados por tipo de licor, nas amostras de licores à base de café foram quantificadas todas as aminas exceto a 2-metilbutilamina, a isoamilamina e a amilamina, enquanto nas amostras à base de ervas apenas a isobutilamina, 2-metilbutilamina e isoamilamina não foram detetadas. Nos licores à base de frutas foram quantificadas as dezoito aminas biogénicas pesquisadas. Por outro lado, no licor à base de leite foram apenas detetadas 7 aminas (metilamina, dimetilamina, dietilamina, cadaverina, morfolina, histamina e tiramina). Nas amostras à base de mel não estavam presentes a isopropilamina, a 2-metilbutilamina, a isoamilamina e a amilamina.

Na Figura 4.1 está representado o perfil cromatográfico das aminas biogénicas presentes numa amostra de licor, produzido por modo caseiro e que tem como principal matéria-prima fruta (H13), analisada segundo as condições experimentais descritas.

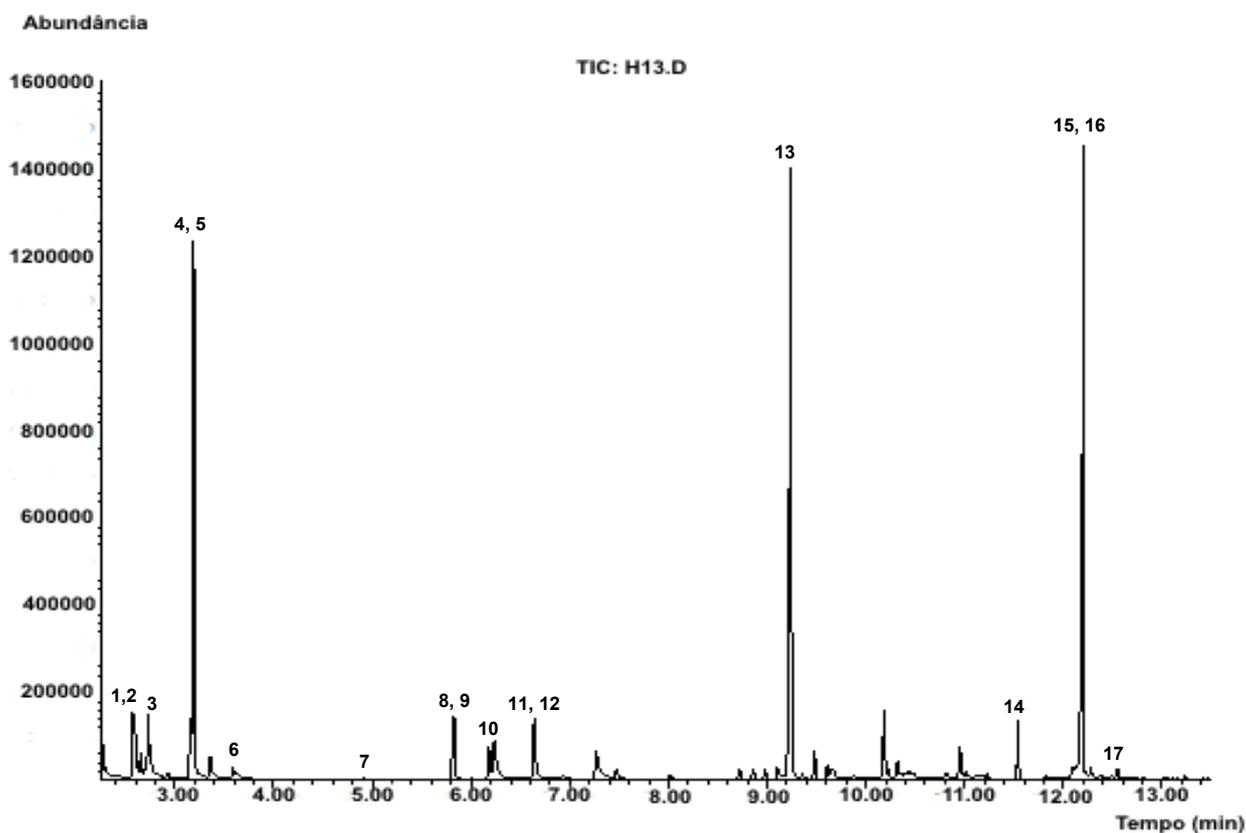


Figura 4.1. Cromatograma representativo do perfil de aminas biogénicas de uma amostra de licor de fabrico caseiro e à base de fruta (H13) (1- metil[$^2\text{H}_3$]amina; 2- metilamina; 3- dimetilamina; 4- etil[$^2\text{H}_5$]amina; 5- etilamina; 6- dietilamina; 7- isobutilamina; 8- 2,2,3,3,4,4,5,5-[$^2\text{H}_8$]pirrolidina; 9- pirrolidina; 10- isoamilamina; 11- morfolina; 12- amilamina; 13- anfetamina (PI); 14- 1,3-diaminopropano; 15- [$^2\text{H}_8$]putrescina; 16- putrescina; 17- cadaverina); análise por GC-MS.

Tabela 4.4. Teor de aminas biogênicas (mg/L) primárias (metilamina, etilamina, isopropilamina, isobutilamina, isoamilamina, 2-metilbutilamina, isoamilamina e amilamina) nas amostras de licorês analisados com diferentes modos de produção e diferentes tipos de matérias-primas utilizadas no seu fabrico (média e desvio-padrão de três leituras da mesma amostra); análise por GC-MS.

Amostra	% ^a	Modo ^b	Tipo ^c	Metilamina	Etilamina	Isopropilamina	Isobutilamina	2-Metilbutilamina	Isoamilamina	Amilamina
H4		1	1	0,03 ± 0,001	0,03 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H6		1	1	0,48 ± 0,001	0,11 ± 0,001	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.
H10		1	1	0,08 ± 0,001	0,01 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H16		1	2	1,12 ± 0,01	0,02 ± 0,001	0,01 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H17		1	2	n.d.	0,01 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H18		1	2	n.d.	0,01 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H19		1	2	n.d.	0,01 ± 0,001	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H22		1	2	0,07 ± 0,002	0,01 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,09 ± 0,001
H13		1	3	0,23 ± 0,002	0,96 ± 0,003	n.d.	0,03 ± 0,001	n.d.	<LQ	<LQ
H15		1	3	0,03 ± 0,001	0,05 ± 0,001	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H20		1	3	n.d.	0,14 ± 0,001	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.
H24		1	3	0,06 ± 0,001	0,04 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,02 ± 0,001
H26		1	3	0,13 ± 0,001	0,19 ± 0,002	<LQ	n.d.	0,04 ± 0,001	n.d.	n.d.
H7		1	5	0,10 ± 0,001	0,08 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H8		1	5	0,09 ± 0,001	0,03 ± 0,001	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.
C21	18	2	1	1,05 ± 0,003	0,05 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C23	33	2	1	1,10 ± 0,008	0,02 ± 0,001	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C3	21	2	2	n.d.	0,05 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ
C5	22	2	2	<LQ	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C11	40	2	2	0,17 ± 0,002	0,02 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabela 4.4. (cont.)

Amostra	% ^a	Modo ^b	Tipo ^c	Metilamina	Etilamina	Isopropilamina	Isobutilamina	2-Metilbutilamina	Isoamilamina	Amilamina
C1	40	2	3	0,09 ± 0,001	0,02 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C2	30	2	3	0,02 ± 0,001	0,03 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C9	25	2	3	0,24 ± 0,003	0,03 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C12	24	2	3	0,07 ± 0,001	0,06 ± 0,002	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C25	19	2	3	0,12 ± 0,002	0,11 ± 0,001	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C27	20	2	3	0,09 ± 0,001	0,05 ± 0,001	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C14	20	2	4	0,01 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a Teor alcoólico (% vol.) contido no rótulo das amostras comerciais.

^b Modo de produção: 1 – caseiro; 2 – comercial.

^c Tipo de licor: 1 – à base de café; 2 – à base de ervas; 3 – à base de frutas; 4 – à base de leite; 5 – à base de mel.
n.d. – não detetado

<LQ – o valor de concentração detetado é inferior ao limite de quantificação.

Tabela 4.5. Teor de aminas biogénicas (mg/L) secundárias (dimetilamina e dietilamina) nas amostras de licores analisados com diferentes modos de produção e diferentes tipos de matérias-primas utilizadas no seu fabrico (média e desvio-padrão de três leituras da mesma amostra); análise por GC-MS.

Amostra	% ^a	Modo ^b	Tipo ^c	Dimetilamina	Dietilamina
H4		1	1	0,07 ± 0,001	<LQ
H6		1	1	1,98 ± 0,01	0,02 ± 0,001
H10		1	1	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001
H16		1	2	0,14 ± 0,002	0,01 ± 0,001
H17		1	2	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,001
H18		1	2	0,03 ± 0,001	0,01 ± 0,001
H19		1	2	2,02 ± 0,02	0,01 ± 0,001
H22		1	2	0,04 ± 0,001	<LQ
H13		1	3	0,04 ± 0,001	0,01 ± 0,001
H15		1	3	0,06 ± 0,001	0,01 ± 0,001
H20		1	3	0,03 ± 0,001	0,01 ± 0,001
H24		1	3	0,04 ± 0,001	0,02 ± 0,001
H26		1	3	0,05 ± 0,001	0,01 ± 0,001
H7		1	5	0,58 ± 0,005	0,01 ± 0,001
H8		1	5	0,37 ± 0,004	<LQ
C21	18	2	1	0,90 ± 0,01	0,02 ± 0,001
C23	33	2	1	0,30 ± 0,006	0,02 ± 0,001
C3	21	2	2	0,51 ± 0,008	n.d.
C5	22	2	2	0,05 ± 0,001	<LQ
C11	40	2	2	n.d.	0,01 ± 0,001
C1	40	2	3	0,02 ± 0,001	0,01 ± 0,001
C2	30	2	3	0,17 ± 0,003	0,01 ± 0,001
C9	25	2	3	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,001
C12	24	2	3	0,03 ± 0,001	0,01 ± 0,001
C25	19	2	3	0,10 ± 0,002	0,01 ± 0,001
C27	20	2	3	0,12 ± 0,003	0,01 ± 0,001
C14	20	2	4	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001

^a Teor alcoólico (% vol.) contido no rótulo das amostras comerciais.

^b Modo de produção: 1 – caseiro; 2 – comercial.

^c Tipo de licor: 1 – à base de café; 2 – à base de ervas; 3 – à base de frutas; 4 – à base de leite; 5 – à base de mel.

n.d. – não detetado.

<LQ – o valor de concentração detetado é inferior ao limite de quantificação.

Tabela 4.6. Teor de aminas biogénicas (mg/L) diaminas (1,3-diaminopropano, putrescina e cadaverina) nas amostras de licores analisados com diferentes modos de produção e diferentes tipos de matérias-primas utilizadas no seu fabrico (média e desvio-padrão de três leituras da mesma amostra); análise por GC-MS.

Amostra	% ^a	Modo ^b	Tipo ^c	1,3-Diaminopropano	Putrescina	Cadaverina
H4		1	1	0,07 ± 0,002	0,36 ± 0,007	0,07 ± 0,001
H6		1	1	0,04 ± 0,001	0,06 ± 0,002	0,05 ± 0,001
H10		1	1	0,01 ± 0,001	n.d.	0,06 ± 0,001
H16		1	2	0,01 ± 0,001	0,03 ± 0,001	0,01 ± 0,001
H17		1	2	n.d.	n.d.	0,09 ± 0,003
H18		1	2	<LQ	n.d.	0,15 ± 0,003
H19		1	2	0,03 ± 0,001	n.d.	0,06 ± 0,001
H22		1	2	0,07 ± 0,003	n.d.	0,09 ± 0,002
H13		1	3	<LQ	2,47 ± 0,03	0,08 ± 0,001
H15		1	3	0,01 ± 0,001	1,06 ± 0,01	0,11 ± 0,001
H20		1	3	n.d.	n.d.	0,01 ± 0,001
H24		1	3	n.d.	0,04 ± 0,001	<LQ
H26		1	3	n.d.	0,11 ± 0,002	0,04 ± 0,001
H7		1	5	<LQ	0,11 ± 0,001	0,17 ± 0,002
H8		1	5	0,01 ± 0,001	0,65 ± 0,008	0,03 ± 0,001
C21	18	2	1	<LQ	n.d.	0,01 ± 0,001
C23	33	2	1	<LQ	0,04 ± 0,001	0,01 ± 0,001
C3	21	2	2	<LQ	n.d.	0,01 ± 0,001
C5	22	2	2	0,01 ± 0,001	n.d.	0,02 ± 0,001
C11	40	2	2	0,03 ± 0,001	0,04 ± 0,001	0,02 ± 0,001
C1	40	2	3	n.d.	n.d.	0,01 ± 0,001
C2	30	2	3	0,04 ± 0,001	0,03 ± 0,001	0,06 ± 0,001
C9	25	2	3	<LQ	n.d.	0,01 ± 0,001
C12	24	2	3	<LQ	0,15 ± 0,002	0,04 ± 0,001
C25	19	2	3	n.d.	0,60 ± 0,008	0,03 ± 0,001
C27	20	2	3	n.d.	0,17 ± 0,002	0,08 ± 0,001
C14	20	2	4	n.d.	n.d.	0,02 ± 0,001

^a Teor alcoólico (% vol.) contido no rótulo das amostras comerciais.

^b Modo de produção: 1 – caseiro; 2 – comercial.

^c Tipo de licor: 1 – à base de café; 2 – à base de ervas; 3 – à base de frutas; 4 – à base de leite; 5 – à base de mel.

n.d. – não detetado.

<LQ – o valor de concentração detetado é inferior ao limite de quantificação.

Tabela 4.7. Teor de aminas biogénicas (mg/L) N-heterocíclicas (pirrolidina, morfolina, piperidina, piperidina e histamina) nas amostras de licores analisados com diferentes modos de produção e diferentes tipos de matérias-primas utilizadas no seu fabrico (média e desvio-padrão de três leituras da mesma amostra); análise por GC-MS.

Amostra	% ^a	Modo ^b	Tipo ^c	Pirrolidina	Morfolina	Piperidina	Histamina
H4		1	1	n.d.	0,51 ± 0,005	0,03 ± 0,001	0,16 ± 0,002
H6		1	1	0,76 ± 0,007	0,48 ± 0,003	0,11 ± 0,001	0,07 ± 0,001
H10		1	1	n.d.	0,15 ± 0,002	n.d.	0,04 ± 0,001
H16		1	2	0,07 ± 0,001	0,16 ± 0,002	0,06 ± 0,001	0,24 ± 0,003
H17		1	2	n.d.	0,11 ± 0,001	n.d.	0,12 ± 0,002
H18		1	2	n.d.	0,10 ± 0,001	n.d.	0,03 ± 0,001
H19		1	2	n.d.	0,17 ± 0,002	n.d.	n.d.
H22		1	2	n.d.	0,67 ± 0,008	n.d.	0,17 ± 0,005
H13		1	3	0,31 ± 0,003	0,30 ± 0,005	n.d.	0,19 ± 0,002
H15		1	3	0,15 ± 0,002	0,28 ± 0,002	n.d.	<LQ
H20		1	3	n.d.	0,32 ± 0,004	n.d.	0,09 ± 0,001
H24		1	3	0,21 ± 0,003	0,15 ± 0,002	n.d.	0,17 ± 0,002
H26		1	3	0,04 ± 0,001	0,34 ± 0,004	n.d.	0,15 ± 0,003
H7		1	5	0,52 ± 0,005	0,35 ± 0,005	n.d.	0,07 ± 0,001
H8		1	5	0,14 ± 0,002	0,25 ± 0,003	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,001
C21	18	2	1	0,08 ± 0,001	0,51 ± 0,005	0,05 ± 0,001	0,18 ± 0,002
C23	33	2	1	0,05 ± 0,001	0,14 ± 0,002	0,03 ± 0,001	0,16 ± 0,002
C3	21	2	2	n.d.	0,49 ± 0,005	n.d.	0,04 ± 0,001
C5	22	2	2	n.d.	0,17 ± 0,003	n.d.	n.d.
C11	40	2	2	0,12 ± 0,001	0,18 ± 0,001	0,01 ± 0,001	n.d.

Tabela 4.7. (cont.)

Amostra	% ^a	Modo ^b	Tipo ^c	Pirrolidina	Morfina	Piperidina	Histamina
C1	40	2	3	n.d.	0,14 ± 0,001	n.d.	0,02 ± 0,001
C2	30	2	3	n.d.	0,25 ± 0,003	n.d.	0,04 ± 0,001
C9	25	2	3	n.d.	0,34 ± 0,003	n.d.	0,05 ± 0,001
C12	24	2	3	0,04 ± 0,001	0,26 ± 0,003	n.d.	0,04 ± 0,001
C25	19	2	3	n.d.	0,34 ± 0,003	n.d.	0,07 ± 0,001
C27	20	2	3	n.d.	0,27 ± 0,003	n.d.	0,06 ± 0,001
C14	20	2	4	n.d.	0,09 ± 0,001	n.d.	0,01 ± 0,001

^a Teor alcoólico (% vol.) contido no rótulo das amostras comerciais.

^b Modo de produção: 1 – caseiro; 2 – comercial.

^c Tipo de licor: 1 – à base de café; 2 – à base de ervas; 3 – à base de frutas; 4 – à base de leite; 5 – à base de mel.
n.d. – não detetado.

<LQ – o valor de concentração detetado é inferior ao limite de quantificação.

Tabela 4.8. Teor de aminas biogênicas (mg/L) aromáticas (2-feniletilamina e tiramina) nas amostras de licores analisados com diferentes modos de produção e diferentes tipos de matérias-primas utilizadas no seu fabrico (média e desvio-padrão de três leituras da mesma amostra); análise por GC-MS.

Amostra	% ^a	Modo ^b	Tipo ^c	2-Feniletilamina	Tiramina
H4		1	1	n.d.	0,03 ± 0,001
H6		1	1	n.d.	0,03 ± 0,001
H10		1	1	<LQ	<LQ
H16		1	2	n.d.	0,01 ± 0,001
H17		1	2	n.d.	0,02 ± 0,001
H18		1	2	n.d.	0,01 ± 0,001
H19		1	2	<LQ	0,01 ± 0,001
H22		1	2	n.d.	0,05 ± 0,002
H13		1	3	n.d.	0,04 ± 0,001
H15		1	3	n.d.	0,01 ± 0,001
H20		1	3	0,02 ± 0,001	0,14 ± 0,001
H24		1	3	n.d.	0,03 ± 0,001
H26		1	3	0,05 ± 0,001	0,03 ± 0,001
H7		1	5	0,13 ± 0,001	0,06 ± 0,001
H8		1	5	0,03 ± 0,001	0,04 ± 0,001
C21	18	2	1	n.d.	0,03 ± 0,001
C23	33	2	1	n.d.	0,02 ± 0,001
C3	21	2	2	n.d.	0,01 ± 0,001
C5	22	2	2	n.d.	n.d.
C11	40	2	2	n.d.	0,02 ± 0,001
C1	40	2	3	n.d.	<LQ
C2	30	2	3	n.d.	0,05 ± 0,001
C9	25	2	3	n.d.	0,02 ± 0,001
C12	24	2	3	n.d.	0,02 ± 0,001
C25	19	2	3	0,03 ± 0,001	0,02 ± 0,001
C27	20	2	3	0,03 ± 0,001	0,01 ± 0,001
C14	20	2	4	n.d.	0,02 ± 0,001

^a Teor alcoólico (% vol.) contido no rótulo das amostras comerciais.

^b Modo de produção: 1 – caseiro; 2 – comercial.

^c Tipo de licor: 1 – à base de café; 2 – à base de ervas; 3 – à base de frutas; 4 – à base de leite; 5 – à base de mel.

n.d. – não detetado.

<LQ – o valor de concentração detetado é inferior ao limite de quantificação.

4.2.2 Discussão dos resultados

4.2.2.1 Análise individual das aminas

Como se pode observar pela análise da Figura 4.2, apenas a cadaverina e a morfolina estão presentes em todas as 27 amostras analisadas. A etilamina, a dimetilamina, a dietilamina e a tiramina foram detetadas em 26 amostras. Por outro lado, a 2-metilbutilamina, a isobutilamina e a amilamina foram detetadas em apenas 2, 3 e 4 amostras, respetivamente.

A isoamilamina foi detetada numa só amostra, embora num nível tão baixo que não foi possível a sua quantificação

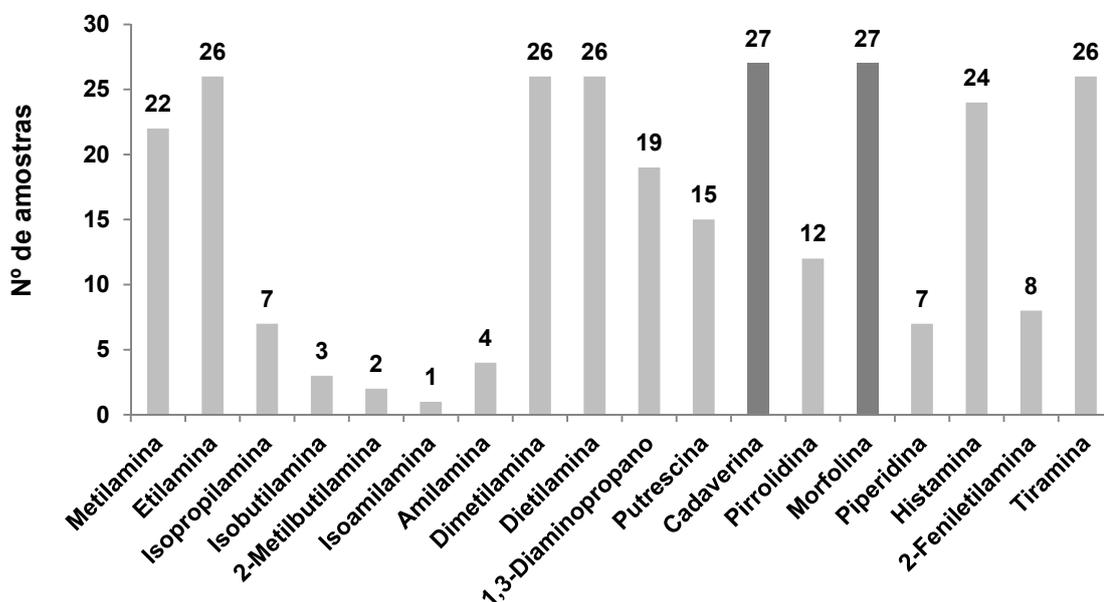


Figura 4.2. Frequência das 18 aminas biogénicas analisadas num total de 27 amostras de licores.

Observando a frequência das aminas agrupadas consoante a sua estrutura química (Figura 4.3) verifica-se que, as duas aminas secundárias estão presentes em 29% das amostras analisadas, seguidas das três diaminas presentes em 23% das amostras, as quatro aminas N-heterocíclicas e as duas aminas aromáticas presentes em 19% em cada, e por fim as sete aminas primárias que foram detetadas em 10% das amostras.

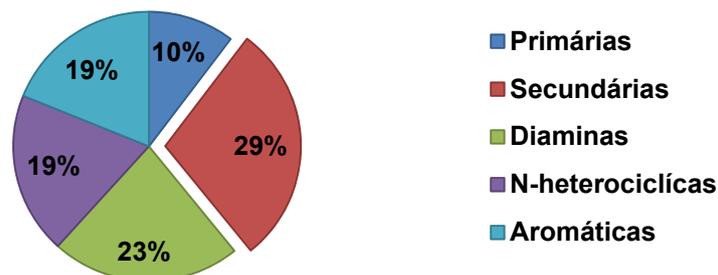


Figura 4.3. Frequência em percentagem (%) das 18 aminas biogénicas analisadas em amostras de licores, agrupadas de acordo com a sua estrutura química.

Tendo em conta que os licores são matrizes distintas de outras bebidas alcoólicas como cerveja e vinho e dada a escassez de estudos nesta matriz no que se refere à presença de aminas biogénicas, será feita uma comparação com os teores presentes nessas bebidas bem como em bebidas fermentadas. Assim, pela análise em detalhe de cada amina biogénica detetada nas amostras de licores e tendo por base a Figura 4.4 podemos observar:

Aminas primárias

As aminas alifáticas de baixa massa molecular (como as aminas primárias) são classificadas como as mais tóxicas substâncias usadas rotineiramente em escala industrial (Manahan, 1992). A metilamina foi determinada como a principal amina primária nos licores analisados, com níveis entre n.d.-1,12 mg/L, seguida pela etilamina (n.d.-0,96 mg/L), amilamina (n.d.-0,09 mg/L), 2-metilbutilamina (n.d.-0,04 mg/L), isobutilamina (n.d.-0,03 mg/L) e isopropilamina (n.d.-0,01 mg/L) (Tabela 4.4). A isoamilamina foi detetada em apenas uma amostra, com concentração inferior ao limite de quantificação.

A etilamina e isoamilamina foram apontadas por Cunha *et al.* (2011) como as mais constantes e significativas aminas primárias presentes nos vinhos, em concentrações na sua maioria superiores às detetadas nas amostras de licores, com valores médios de 2,46 mg/L para a etilamina e 0,57 mg/L para a isoamilamina. O mesmo acontece quando se compara os licores com bebidas fermentadas à base de cereais, em que a metilamina foi quantificada nas amostras com níveis de concentração entre 0,20 e 1,70 mg/kg e a etilamina entre 0,60 e 5,00 mg/kg (Yeğın e Üren, 2008).

Quando comparados com amostras de cervejas, os teores de aminas primárias obtidos em licores são mais elevados. Na cerveja a concentração de metilamina varia entre 0,06 e 0,16 mg/L, a de etilamina entre 0,08 e 0,26 mg/L e a de isoamilamina entre 0,01 e 0,03 mg/L (Fernandes *et al.*, 2001). No entanto, as diferenças obtidas tanto nos vinhos como

nas bebidas fermentadas base à de cereais e nas cervejas são esperadas pois trata-se de matrizes relativamente distintas com matérias-primas e processos de fabrico diferentes.

Aminas secundárias

Das duas aminas secundárias analisadas (dimetilamina e dietilamina) (Tabela 4.5) a dimetilamina, presente em concentrações entre n.d. e 2,02 mg/L, destaca-se pelo seu potencial de reação com o nitrito e formação do N-nitroso-dimetilamina, composto hepatotóxico e carcinogénico. Os valores encontrados foram similares aos detetados por Almeida *et al.* (2012) em amostras de cerveja (0,12-1,93 mg/L) mas, no entanto, mais elevados do que os descritos por Fernandes *et al.* (2001) (0,31-0,97 mg/L) igualmente em cervejas. Em vinhos, a dimetilamina está presente em baixas concentrações, rondando os 0,08 mg/L (Cunha *et al.*, 2011).

A outra amina secundária quantificada foi a dietilamina, com níveis entre n.d. e 0,02 mg/L, os quais são inferiores aos obtidos em cervejas com concentrações entre 0,06 e 0,08 mg/L (Almeida *et al.*, 2012).

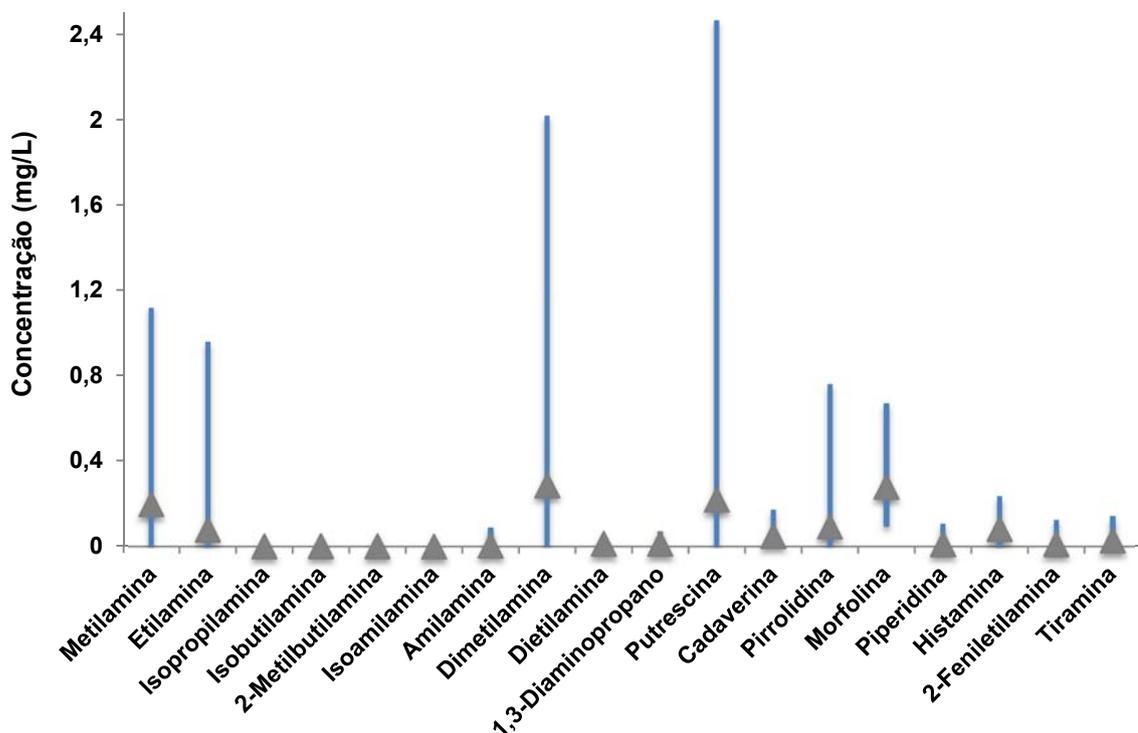


Figura 4.4. Valores máximos, mínimos e médias (▲) da concentração (mg/L) das 18 aminas biogénicas analisadas em amostras de licores.

Diaminas

A putrescina, a cadaverina e o 1,3-diaminopropano são as diaminas encontradas nas amostras de licores analisadas (Tabela 4.6). A elevada presença da putrescina em bebidas alcoólicas pode ser explicada pela existência de compostos endógenos nas matérias-primas e pela possibilidade de ser produzida por microrganismos através da descarboxilação de diversos aminoácidos.

De todas as aminas analisadas a diamina mais expressiva foi a putrescina com níveis de n.d. a 2,47 mg/L, valores inferiores aos reportados em amostras de cerveja. A putrescina é a amina predominante em cerveja com valores entre 2,10 e 12,78 mg/L (Almeida *et al.*, 2012), entre 3,11 e 6,85 mg/L (Fernandes *et al.*, 2001) e entre 2,12 e 8,23 mg/L (Tang *et al.*, 2009). Em vinhos verifica-se ainda uma maior concentração da putrescina quando comparado com amostras de cerveja como é exemplo, 2,40 a 31,80 mg/L em vinhos tintos, 0,80 a 12,80 mg/L em vinhos brancos e 1,40 a 9,90 mg/L em vinhos rosé (Martuscelli *et al.*, 2013); e n.d. a 26,54 mg/L (Marcobal *et al.*, 2005) e n.d. a 9,07 mg/L (Proestos *et al.*, 2008) em vinhos tintos.

A presença de diaminas em bebidas fermentadas também foi determinada. Cosansu (2009) quantificou a putrescina em 7 amostras, com teores entre 0,32 e 9,80 mg/kg. Yeğın e Üren (2008) também determinaram a putrescina em amostras de boza com níveis de 0,40 a 5,60 mg/kg, em ambos os casos os valores são superiores aos obtidos nas amostras de licores.

A cadaverina, presente em todas as amostras, apresentou teores entre 0,01 e 0,17 mg/L, inferiores aos obtidos em amostras de cervejas por Almeida *et al.* (2012) (0,19-1,38 mg/L), em vinhos por García-Villar *et al.* (2009) (0,07-0,46 mg/L) e em bebidas fermentadas à base de cereais por Yeğın e Üren (2008) (1,10 a 1,50 mg/kg) e por Cosansu (2009) (1,03-17,69 mg/kg). O 1,3-diaminopropano variou entre n.d. e 0,07 mg/L, com valores igualmente inferiores quando comparados com outras bebidas alcoólicas.

Aminas N-heterocíclicas

Das aminas N-heterocíclicas encontradas nas amostras de licores a histamina é uma das aminas de maior preocupação, juntamente com a tiramina, devido às suas propriedades toxicológicas. A histamina foi detetada em 24 das 27 amostras analisadas, com concentrações entre n.d. e 0,24 mg/L (Tabela 4.7), valores similares aos encontrados por Almeida *et al.* (2012) em cervejas (0,02-0,34 mg/L). No entanto, valores mais elevados foram encontrados noutros estudos efetuados como, 0,63 a 5,80 mg/L (Izquierdo-Pulido *et al.*, 1996), 0,48 a 2,11 mg/L (Zotou *et al.*, 2003) e 0,65 a 4,62 mg/L (Tang *et al.*, 2009). Valores idênticos são encontrados em bebidas fermentadas à base de cereais, com

concentrações entre 0,12 e 4,07 mg/kg (Cosansu, 2009) e entre 1,50 e 7,90 mg/kg (Yeğın e Üren, 2008).

Nos vinhos os valores de histamina encontrados são mais elevados do que na cerveja, com concentrações de 2,00 a 15,00 mg/L (García-Villar *et al.*, 2009), de n.d. a 6,67 mg/L (Özdestan e Üren, 2009) e de 1,72 a 8,86 mg/L (García-Marino *et al.*, 2010).

Outras aminas heterocíclicas encontradas são a morfolina, a pirrolidina e a piperidina. A concentração da morfolina presente nas amostras variou entre 0,09 e 0,67 mg/L, a de piperidina entre n.d. e 0,11 mg/L e da pirrolidina entre n.d. e 0,76 mg/L. Até à data não existem estudos que indiquem a presença da morfolina, tanto em amostras de cerveja como em amostras de vinho.

No que respeita à piperidina, existe apenas uma indicação da sua presença em cerveja, com concentrações entre 0,01 e 0,07 mg/L (Almeida *et al.*, 2012), valores inferiores aos encontrados nas amostras de licores.

A presença da pirrolidina em bebidas alcoólicas é raramente reportada na bibliografia com a exceção de Fernandes *et al.* (2001), Slomkowska e Ambroziak (2002) e Almeida *et al.* (2012) em amostras de cervejas com concentrações que variam entre 0,04 e 0,19 mg/L, n.d. e 0,57 mg/L e 0,13 e 1,78 mg/L, respetivamente. Em vinhos, apenas Cunha *et al.* (2011) reporta a presença da pirrolidina em amostras de vinhos do Porto com concentrações de 0,04 a 1,28 mg/L, valores igualmente superiores aos obtidos nas amostras de licores.

Aminas aromáticas

A tiramina foi detetada em 26 amostras analisadas, com níveis entre n.d. e 0,14 mg/L (Tabela 4.8). Estes valores são bastantes inferiores aos reportados na literatura para amostras de cervejas como é exemplo, teores de concentração entre 0,47 e 1,65 mg/L (Fernandes *et al.*, 2001), entre 0,39 e 5,92 mg/L (Almeida *et al.*, 2012) e entre 2,96 e 7,15 mg/L (Tang *et al.*, 2009). Os valores obtidos são similares quando comparados com vinhos, especialmente vinhos do Porto Vintage e Tawny, com teores entre 0,01 e 0,45 mg/L (Cunha *et al.*, 2011). O mesmo acontece com vinhos tintos turcos com valores entre n.d. e 0,29 mg/L (Anli *et al.*, 2004). Estes valores são genericamente baixos quando comparados com os encontrados em amostras de boza por Cosansu (2009), que verificaram ser a tiramina a mais prevalente com um máximo de 82,79 mg/kg.

Outra amina aromática presente em 8 das 27 amostras analisadas é a 2-feniletilamina com níveis de concentração entre n.d. e 0,13 mg/L (média, 0,05 mg/L). Os valores adquiridos no presente estudo na sua maioria são inferiores aos de outras bebidas alcoólicas, nas quais a concentração varia entre n.d. e 0,37 mg/L (Anli *et al.*, 2004), 0,04 e 2,34 mg/L (Cunha *et al.*, 2011) e n.d. e 1,35 mg/L (García-Marino *et al.*, 2010) em vinhos;

e entre n.d. e 0,42 mg/L (Tang *et al.*, 2009), entre 0,04 e 0,15 mg/L (Almeida *et al.*, 2012) e entre 0,01 e 0,06 mg/L (Fernandes *et al.*, 2001) em cervejas. Em amostras de boza a sua concentração é mais elevada, com teores entre 0,17 e 4,53 mg/kg (Cosansu, 2009).

4.2.2.2 Análise por modos de produção

No que respeita aos diferentes modos de produção, pode observar-se que no modo de produção caseiro o teor médio total de aminos presentes nas 15 amostras analisadas foi de 1,67 mg/L. No modo de produção comercial o valor foi inferior, obtendo-se uma média de 0,98 mg/L nas 12 amostras analisadas.

Tal como se pode observar pela Figura 4.5, as amostras caseiras têm maior concentração em aminos secundárias, diaminas, aminos N-heterocíclicas e aminos aromáticas do que as amostras comerciais. Relativamente às aminos primárias, a concentração média total foi similar nas amostras caseiras e nas comerciais. Os elevados valores de desvio-padrão em cada um dos grupos de aminos analisados indica uma elevada variação na concentração de aminos entre as amostras; o que pode ser explicado pelas distintas composições dos licores em análise.

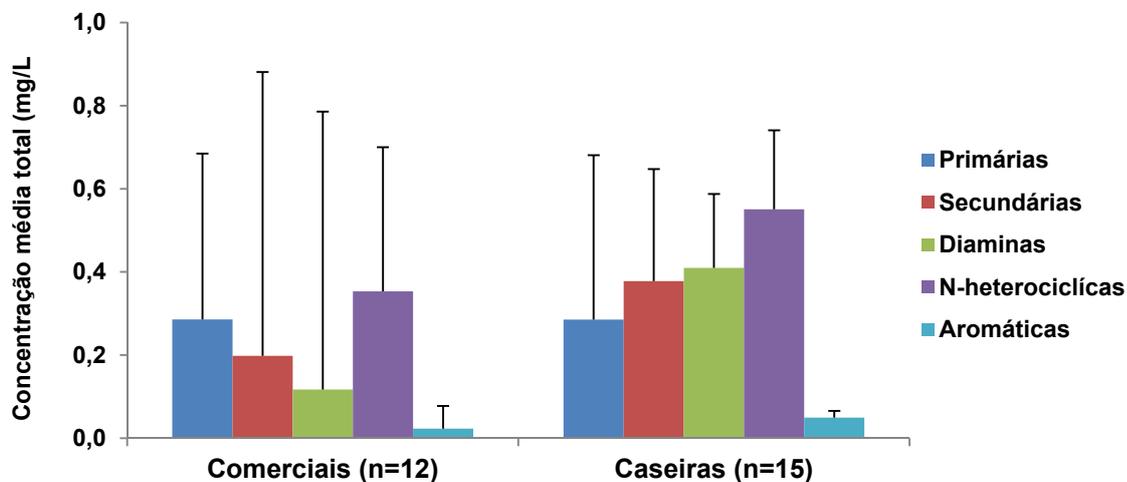


Figura 4.5. Concentração média total e desvio-padrão (mg/L) de aminos biogénicas, agrupadas de acordo com a sua estrutura química, em amostras de licores com diferentes modos de produção (comercial e caseiro).

Após a análise estatística dos resultados conclui-se que para as aminos 1,3-diaminopropano, cadaverina, pirrolidina, histamina e tiramina existem diferenças estatísticas significativas entre os dois modos de produção avaliados ($p < 0,05$) (Tabela 4.9). A concentração destas cinco aminos nas amostras caseiras é significativamente superior à das amostras comerciais. Tal facto pode ser explicado pelo uso de matérias-primas de menor qualidade e a aplicação de condições de processamento e

armazenamento deficientes na confeção de licores caseiros, dando origem consequentemente a maiores quantidades de aminas biogénicas nestas bebidas.

Tabela 4.9. Valores medianos, entre parênteses mínimos e máximos (mg/L) de cada uma das 18 aminas analisadas em diferentes modos de produção (comercial e caseiro).

Aminas biogénicas	Comerciais	Caseiras	p^*
Metilamina	0,09 (0,01-1,11)	0,09 (0,02-1,13)	0,934
Etilamina	0,04 (0,01-0,11)	0,03 (0,01-0,96)	0,956
Isopropilamina	<LQ	<LQ	0,522
Isobutilamina	n.d.	0,01 (<LQ-0,03)	-
2-Metilbutilamina	n.d.	0,02 (<LQ-0,04)	-
Isoamilamina	n.d.	<LQ	-
Amilamina	<LQ	0,02 (<LQ-0,09)	0,405
Dimetilamina	0,10 (0,01-0,91)	0,05 (0,01-2,03)	0,915
Dietilamina	0,01 (<LQ-0,02)	0,01 (<LQ-0,02)	0,244
1,3-Diaminopropano	0,01 (<LQ-0,04) ^a	0,01 (<LQ-0,07) ^b	0,010
Putrescina	0,09 (0,03-0,61)	0,11 (0,03-2,50)	0,078
Cadaverina	0,02 (0,01-0,08) ^a	0,06 (<LQ-0,17) ^b	<0,001
Pirrolidina	0,07 (0,04-0,12) ^a	0,18 (0,04-0,77) ^b	0,003
Morfolina	0,25 (0,09-0,52)	0,28 (0,10-0,67)	0,648
Piperidina	0,03 (0,01-0,05)	0,04 (0,01-0,11)	0,201
Histamina	0,04 (0,01-0,17) ^a	0,11 (<LQ-0,24) ^b	0,016
2-Feniletilamina	0,03 (0,02-0,03)	0,02 (<LQ-0,13)	0,463
Tiramina	0,02 (<LQ-0,05) ^a	0,03 (<LQ-0,15) ^b	0,014

Valores medianos com letras diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).

*Valores de p obtidos através do teste de Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

<LQ – o valor de concentração detetado é inferior ao limite de quantificação.

4.2.2.3 Análise por tipos de licores

Relativamente aos tipos de licores analisados, a concentração média total de aminas presentes nos cinco licores tipo 1 (à base de café) foi de 2,11 mg/L, de 1,02 mg/L nos oito licores tipo 2 (à base de ervas), de 1,27 mg/L nos onze licores tipo 3 (à base de frutas), de 0,18 mg/L no licor tipo 4 (à base de leite) e de 1,94 mg/L nos dois licores tipo 5 (à base de mel).

Pela análise da Figura 4.6 pode observar-se que os licores à base de café apresentam maior quantidade de aminas primárias, secundárias e N-heterocíclicas, seguidos pelos licores à base de mel. Quanto às diaminas e às aminas aromáticas estas são mais elevadas nos licores à base de frutas e nos licores à base de mel, respetivamente.

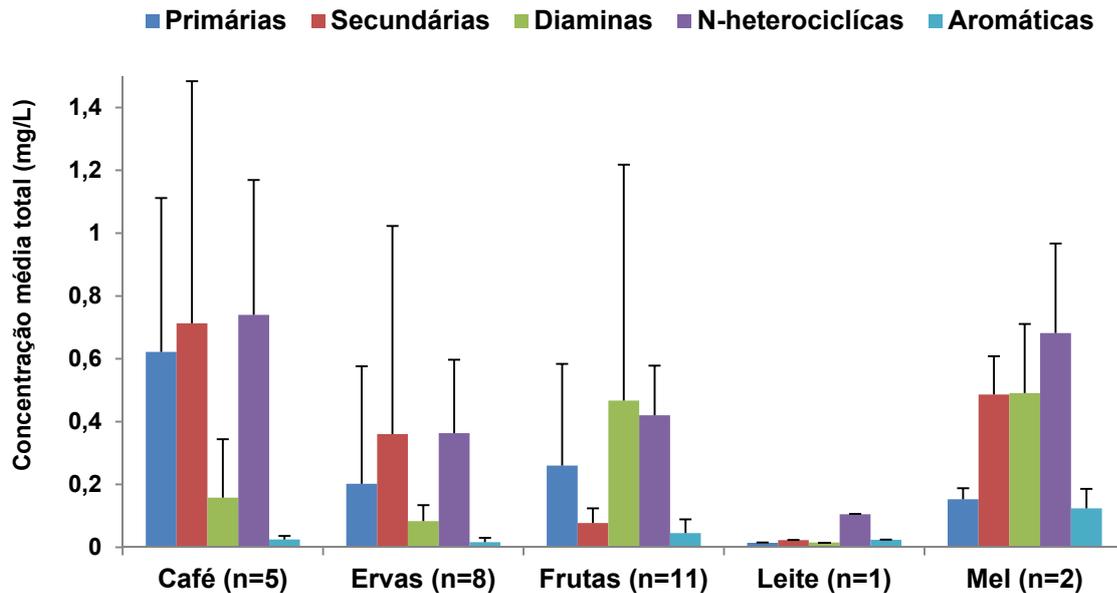


Figura 4.6. Concentração média total e desvio-padrão (mg/L) de aminas biogênicas, agrupadas de acordo com a sua estrutura química, em diferentes tipos de amostras de licores (tipo 1- café, tipo 2- ervas, tipo 3- frutas, tipo 4- leite e tipo 5- mel).

A concentração de aminas biogênicas presente nas 27 amostras analisadas decresce segundo a seguinte ordem: licores à base de café, licores à base de mel, licores à base de frutas, licores à base de ervas e por fim licores à base de leite.

Licores à base de café

Amorim *et al.* (1977) foram os primeiros autores a estudar os níveis de aminas livres em café verde no qual detetaram três poliaminas, a putrescina, a espermina e a espermidina. No entanto, apenas a putrescina foi detetada e quantificada após a torra do grão verde (240°C durante 10 minutos), o que sugere que este tipo de processamento tem influência na quantidade e no perfil de aminas presentes no café torrado.

Diferentes origens, práticas de cultivo e qualidade do grão de café são alguns dos fatores que influenciam a presença de aminas bioativas em bebidas de café (Oliveira *et al.*, 2005). Özdestan (2014) detetou e quantificou elevadas quantidades de aminas bioativas em variedades de café turco moído e em bebidas de café. No café moído foram detetadas a putrescina, cadaverina, triptamina, 2-feniletilamina, a tiramina e a serotonina com teores totais entre 126,00 e 325,20 mg/kg (média, 227,30 mg/L). A histamina não foi detetada em nenhuma amostra e a serotonina foi a amina bioativa mais abundante, com teores médios de 107,30 mg/kg. Na bebida de café, a 2-feniletilamina não foi detetada e com as altas temperaturas ocorreu uma diminuição do teor total de aminas situado entre 5,68 e 48,88 mg/L.

Silveira *et al.* (2007) aponta a tiramina como a mais prevalente em cafés solúveis, detetada num total de 68 amostras analisadas. O nível total de amins nas 68 amostras analisadas situou-se entre 2,80 e 27,60 mg/kg, valores igualmente inferiores aos limites de aceitabilidade.

De facto, os teores de amins biogénicas em produtos crus são elevados, o que não se verifica quando se comparam com bebidas alcoólicas, em que o valor máximo total de amins considerado seguro é de 10 mg/L.

Os licores de café são elaborados normalmente a partir da maceração dos grãos de café torrado no álcool. Nos licores à base de café analisados a presença de amins biogénicas é pouco acentuada quando comparada com o alimento cru, o que é provado pela análise das amostras em que a putrescina foi quantificada em concentrações entre 0,04 a 0,36 mg/L, a cadaverina entre 0,01 a 0,07 mg/L, a histamina, entre 0,04 a 0,18 mg/L, a tiramina entre 0,02 e 0,03 mg/L e a 2-feniletilamina não foi quantificada em nenhuma amostra e apenas foi detetada numa.

Licores à base de mel

O mel é um alimento rico em aminoácidos, os quais são transferidos para os licores produzidos à base de mel num processo de elaboração simples, em que o mel é fervido junto com água e à qual é adicionado depois o álcool. Segundo Pereira *et al.* (2008) o mel contém quantidades vestigiais de amins biogénicas contendo, no entanto, quantidades significativas dos aminoácidos fenilalanina (valores médios de 10,44 a 159,58 mg/L), glutamina (valores médio de 39,99 a 154,42 mg/L) e lisina (valores médios de 8,71 a 21,11 mg/L). Estes podem ser utilizados pelos microrganismos nos seus processos metabólicos, formando amins biogénicas como a 2-feniletilamina, a putrescina e a cadaverina, as quais estão presentes nas duas amostras caseiras de licor à base de mel analisadas, em concentrações médias de 0,08 mg/L, 0,39 mg/L e 0,10 mg/L, respetivamente.

O aminoácido prolina é o mais predominante em mel, sendo utilizado como medida do nível de aminoácidos totais presentes neste alimento. O seu teor fornece uma estimativa da qualidade do mel e da sua capacidade antioxidante (Bogdanov *et al.*, 2004). Nazal *et al.* (2004) quantificaram o aminoácido prolina como o principal em amostras de mel com concentração média de 342,50 mg/kg, seguido da fenilalanina (média, 161,50 mg/kg) e da lisina (média, 23,63 mg/kg). Paramás *et al.* (2006) quantificaram a prolina em quatro tipos de mel, com teores médios de 800 a 850 mg/kg, valores muito superiores aos obtidos por Nazal *et al.* (2004). A prolina pode dar origem à pirrolidina, amina N-heterocíclica presente nas amostras de licores analisados em teores médios de 0,33 mg/L, igualmente inferiores aos detetados na matéria-prima mel, o que sugere uma perda/degradação dos aminoácidos aquando do fabrico de licores.

Destaque para a presença da dimetilamina nas amostras de licores à base de mel na ordem das 0,48 mg/L, sendo a amina mais predominante neste tipo de licores.

Licores à base de frutas

Poucos estudos estão descritos na literatura no que se refere ao perfil de aminas bioativas em frutas. No entanto, a sua presença em frutas depende da espécie vegetal e do grau de maturação e/ou desenvolvimento (Glória, 2005).

As aminas bioativas presentes nas frutas podem ser formadas durante os processos metabólicos e desempenham um papel importante, no que respeita a funções fisiológicas, para todos os organismos vivos (Fogel, 2009). As aminas mais frequentes em frutas são a putrescina, tiramina, cadaverina e histamina, e as poliaminas espermina e espermidina. Santiago-Silva *et al.* (2011) detetaram a espermina, espermidina, a putrescina, a serotonina e a agmatina em cinco frutos tropicais (ananás, goiaba, papaia, manga e maracujá), com teores totais desde 7,70 mg/kg em manga até 75,30 mg/kg em maracujá. A histamina, tiramina, 2-feniletilamina e cadaverina não foram encontradas em nenhuma das frutas analisadas. Vieira *et al.* (2007) detetaram nove aminas bioativas em sumos de laranja de diferentes marcas com uma concentração total entre 34,90 e 66,60 mg/L, da qual se destaca a putrescina com teores médios de 33,6 mg/L.

Nas amostras de licores analisados, as diferentes matérias-primas (frutas) mostraram um perfil de aminas biogénicas diferente, sugerindo propriedades nutricionais diferentes entre eles. A tiramina foi detetada em todas as amostras à base de frutas, com uma concentração máxima de 0,14 mg/L quantificada numa amostra à base de cereja. A cadaverina, igualmente presente em todas as amostras, apresentou um teor máximo de 0,11 mg/L e a histamina um teor máximo de 0,17 mg/L. Por outro lado, a putrescina não foi detetada em todas as amostras, mas os seus teores situaram-se entre 0,03 e 2,47 mg/L.

Licores à base de ervas

Não existem estudos publicados em relação à presença de aminas em plantas aromáticas e especiarias, no entanto podem conter as poliaminas naturais que estão naturalmente presentes em plantas.

Os licores à base de ervas apresentaram um teor reduzido de aminas como é exemplo, a putrescina (0,03 a 0,04 mg/L), a cadaverina (0,01 a 0,15 mg/L), a histamina (0,03 a 0,24 mg/L) e a tiramina (0,01 a 0,05 mg/L). A metilamina apresentou um teor máximo de 1,12 mg/L e a dimetilamina 2,02 mg/L, ambas em amostras de fabrico caseiro.

Licores à base de leite

A presença de aminas em amostras de leite não tem sido muito estudada pelo facto de que é um alimento processado e que não sofre nenhum processo de fermentação. No entanto, após fermentação do leite há um aumento considerável no teor de aminas que é ainda mais acentuado na produção de queijos (Bodmer *et al.*, 1999).

Notou *et al.* (2014) pesquisaram seis monoaminas em três marcas de leite integral. Apenas a histamina e a propilamina foram quantificadas nas três marcas analisadas, com teores entre 5,46 e 6,85 mg/L para a histamina e entre 1,74 e 8,44 mg/L para a propilamina. A tiramina e a 2-feniletilamina não foram detetadas em nenhuma das amostras. A concentração de aminas total nas diferentes marcas variou entre 7,20 e 17,50 mg/L.

A baixa concentração total de aminas biogénicas no leite pode ser atribuída ao processo de pasteurização, que elimina a flora microbiana, conduzindo à supressão da proteólise e da formação de aminas na matriz (Notou *et al.*, 2014). Tal acontecimento verifica-se na amostra de licor comercial à base de leite analisada, na qual só foram quantificadas sete aminas biogénicas com um teor total de 0,18 mg/L, muito inferior ao obtido no estudo de Notou *et al.* (2014).

Pela análise estatística verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre os cinco tipos de licores nas aminas isobutilamina, etilamina, dimetilamina, dietilamina, putrescina, morfina, histamina, 2-feniletilamina e tiramina ($p < 0,05$), como se pode ver na Tabela 4.10. A concentração destas nove aminas nos licores à base de café, de frutas e de mel é superior à concentração nos licores à base de ervas e de mel.

Tabela 4.10. Valores medianos, entre parênteses mínimo e máximo (mg/L) de cada uma das 18 aminas analisadas em diferentes tipos de licores (à base de café, à base de ervas, à base de frutas, à base de leite e à base de mel).

Aminas biogénicas	Café	Ervas	Frutas	Leite	Mel	p
Metilamina	0,48 (0,02 - 0,11)	0,12 (0,01 - 0,13)	0,09 (0,02 - 0,24)	0,01 (0,01 - 0,02)	0,09 (0,09 - 0,11)	0,067
Etilamina	0,03 (0,01 - 0,11) ^a	0,01 (<LQ - 0,05) ^b	0,05 (0,02 - 0,96) ^c	n.d.	0,05 (0,03 - 0,08) ^{a,c}	<0,001
Isopropilamina	<LQ	0,01 (<LQ - 0,01)	<LQ	n.d.	n.d.	0,645
Isobutilamina	0,01 (<LQ - 0,01) ^a	n.d.	0,03 (0,02 - 0,03) ^b	n.d.	<LQ ^a	0,027
2-Metilbutilamina	n.d.	n.d.	0,02 (<LQ - 0,04)	n.d.	n.d.	-
Isoamilamina	n.d.	n.d.	0,01 (<LQ - 0,01)	n.d.	n.d.	-
Amilamina	n.d.	0,05 (0,01 - 0,09)	0,01 (<LQ - 0,02)	n.d.	n.d.	0,150
Dimetilamina	0,30 (0,01 - 2,00) ^{a,b}	0,05 (0,01-2,03) ^{b,c}	0,04 (0,01 - 0,17) ^c	0,01 (<LQ - 0,01) ^d	0,48 (0,37 - 0,59) ^a	<0,001
Dietilamina	0,02 (<LQ - 0,02) ^a	0,01 (<LQ - 0,02) ^{a,b}	0,01 (0,01 - 0,02) ^a	0,01 (<LQ - 0,01) ^a	<LQ ^b	0,010
1,3-Diaminopropano	0,01 (<LQ - 0,07)	0,01 (<LQ - 0,07)	<LQ	n.d.	<LQ	0,114
Putrescina	0,06 (0,04 - 0,36) ^a	0,03 (0,03 - 0,04) ^b	0,16 (0,03 - 2,50) ^{a,c}	n.d.	0,38 (0,11 - 0,66) ^c	0,004
Cadaverina	0,05 (0,01 - 0,07)	0,04 (<LQ - 0,15)	0,03 (0,01 - 0,11)	0,02 (<LQ - 0,02)	0,10 (0,03 - 0,17)	0,265
Pirrolidina	0,08 (0,05 - 0,77)	0,09 (0,06 - 0,12)	0,15 (0,04 - 0,31)	n.d.	0,33 (0,14 - 0,52)	0,216
Morfolina	0,48 (0,14 - 0,51) ^{a,b}	0,17 (0,10 - 0,67) ^a	0,28 (0,14 - 0,34) ^b	0,09 (0,08 - 0,09) ^c	0,30 (0,24 - 0,36) ^{a,b}	0,008
Piperidina	0,04 (0,03 - 0,11)	0,03 (0,01 - 0,06)	n.d.	n.d.	0,01 (<LQ - 0,01)	0,094
Histamina	0,15 (0,04 - 0,18) ^a	0,12 (0,03 - 0,24) ^{a,b}	0,06 (<LQ - 0,19) ^{b,d}	0,01 (<LQ - 0,01) ^c	0,05 (0,02 - 0,07) ^d	0,004
2-Feniletilamina	<LQ ^a	<LQ ^a	0,03 (0,02 - 0,05) ^b	n.d.	0,07 (0,02 - 0,13) ^b	0,002
Tiramina	0,03 (<LQ - 0,03) ^a	0,01 (0,01 - 0,05) ^a	0,02 (<LQ - 0,15) ^a	0,02 (0,01 - 0,02) ^a	0,05 (0,04 - 0,06) ^b	0,006

Valores medianos com letras diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).

*Valores de p obtidos através do teste de Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

<LQ – o valor de concentração detetado é inferior ao limite de quantificação.

As aminas biogénicas nas amostras de licores analisados seguem a seguinte ordem de concentração: dimetilamina > morfolina > putrescina > metilamina > histamina > etilamina, valores inferiores e distintos quando comparados com outras bebidas alcoólicas como cerveja e vinho e bebidas fermentadas à base de cereais. As aminas que aparecem com mais frequência nas amostras de licores são a morfolina, cadaverina, etilamina, dimetilamina, dietilamina e tiramina.

Apesar de ser esperado um perfil de aminas biogénicas semelhante entre todas as amostras analisadas uma vez que, as matérias-primas maioritárias (água e álcool) e o processo de fabrico são semelhantes, tal não se verificou pois na generalidade verificaram-se diferenças quantitativas entre as amostras caseiras e comerciais e entre as amostras à base de café, à base de ervas, à base de frutas, à base de leite e à base de mel, em algumas das aminas quantificadas.

O teor mais elevado do total de aminas foi detetado numa amostra de licor caseiro e à base de frutas com um total de 4,67 mg/L, valor inferior ao limite considerado seguro (10 mg/L).

Conclusões



O método desenvolvido, que consistiu numa extração por DLLME simultânea com derivatização seguida pela análise por GC-MS, mostrou características muito boas para a determinação das 18 aminas em estudo de uma forma simples e rápida. O método apresentou uma boa linearidade (coeficientes de correlação superiores a 0,999 em todas as aminas analisadas), bons resultados de repetibilidade intra-dia e inter-dia (valor máximo de 10% de coeficiente de variação) e boas recuperações com valores entre 79 e 108%. O limite de deteção foi de 0,004 para todas as aminas biogénicas analisadas. O limite de quantificação determinado foi de 0,01 mg/L, como a concentração mínima na qual as aminas podem ser quantificadas.

Após a análise das diferentes amostras de licores conclui-se que as aminas biogénicas presentes em concentrações mais elevadas nas amostras de licores analisados seguem a seguinte ordem: dimetilamina > morfolina > putrescina > metilamina > histamina > etilamina. As aminas que aparecem com mais frequência nas amostras de licores são a morfolina e a cadaverina, presentes em todas as amostras, e a etilamina, a dimetilamina, a dietilamina e a tiramina presentes em 24 de um total de 27 amostras. Por outro lado, as aminas menos abundantes foram a isoamilamina, a 2-metilbutilamina, a isobutilamina e a amilamina, detetadas em apenas 1, 2, 3 e 4 amostras, respetivamente.

A análise individual de cada amina presente nos licores comparada com outras bebidas alcoólicas como cerveja e vinho, e com bebidas fermentadas mostrou que os licores possuem menor concentração de aminas do que as restantes bebidas alcoólicas, o que pode ser explicado pelo facto de que os licores não serem produtos fermentados; no entanto, podem ser adicionados no processo de fabrico bebidas fermentadas bem como matérias-primas de menor qualidade que vão determinar a presença de aminas biogénicas no produto final.

O perfil e o teor de aminas biogénicas presentes nas diferentes amostras de licores devem-se aos diferentes modos de produção, à qualidade e tipo de matéria-prima utilizada e a possíveis contaminações microbianas durante as operações de produção de cada licor. Deste modo, nos licores produzidos em modo caseiro foram detetadas todas as aminas biogénicas, das quais o grupo das aminas secundárias, das diaminas, das aminas N-heterocíclicas e das aminas aromáticas estão presentes em concentrações superiores às obtidas em amostras de licores comerciais. Por outro lado, as aminas primárias apresentaram teores idênticos nos dois modos de produção. De todas as aminas analisadas, a dietilamina, o 1,3-diaminopropano, a cadaverina, a pirrolidina, a histamina e a tiramina apresentaram teores estatisticamente diferentes nos dois modos de produção avaliados ($p < 0,05$). Estes resultados indicam um possível uso de matérias-primas de menor qualidade, sem uma correta higiene e desinfeção, e deficientes condições de processamento e armazenamento por parte dos produtores “caseiros”.

Quando se comparam licores de diferentes matérias-primas, o perfil e o teor de aminas biogénicas também varia. Os licores à base de café foram os que apresentaram maiores teores de aminas, seguidos pelos licores à base de mel, de frutas, de ervas e por fim de leite.

Os licores de café são elaborados normalmente a partir da maceração dos grãos de café torrado no álcool. Apesar de ser esperado um teor de aminas elevado devido à presença destes compostos nos grãos de café, tal não se verificou. Os teores de aminas nos licores à base de café são inferiores aos obtidos em grãos de café torrado, indicando uma diminuição das aminas biogénicas aquando da elaboração de licores.

O mel é um alimento rico em aminoácidos, os quais são transferidos para os licores que utilizem esta matéria-prima podendo ser convertidos em aminas aquando da presença de microrganismos, especialmente putrefativos. A presença da cadaverina e da putrescina nas amostras dá-nos a indicação da qualidade higiénica dos licores.

Os licores à base de fruta ocupam o terceiro lugar nos tipos de licores com maior concentração de aminas, nos quais foram detetadas todas as aminas estudadas. Este tipo de licores são normalmente produzidos através do processo de maceração, o qual pode introduzir no produto final maior quantidade de compostos nutricionais importantes para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos já existentes no produto.

Apesar de em nenhuma das amostras analisadas ter sido atingido o limite considerado seguro de 10 mg de aminas por litro, todos estes resultados são igualmente importantes tendo em conta a necessidade de avaliar a presença e o rendimento total das aminas biogénicas na dieta humana uma vez que são bons indicadores da qualidade, higiene e segurança dos alimentos pois a presença de aminas biogénicas é indicador da utilização de matérias-primas de fraca qualidade bem como de contaminações devido a deficientes condições de processamento e armazenamento de alimentos.

- Adams, D. (1991). Accumulation of Putrescine in Grapevine Leaves Showing Symptoms of Potassium Deficiency or "Spring Fever". *International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*, 126-132.
- Almeida, C.; Fernandes, J.; Cunha, S. (2012). A novel dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. *Food Control*, 25, 380-388.
- Alpendurada, M. (2000). Review - Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 88, 3-14.
- Amorim, H.; Basso, L.; Crocomo, O.; Teixeira, A. (1977). Polyamines in green and roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 957-958.
- Ancín-Azpilicueta, C.; González-Marco, A.; Jiménez-Moreno, N. (2008). Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(3), 257-275.
- Anli, R.; Bayram, M. (2009). Biogenic Amines in Wines. *Food Reviews International*, 25, 186-102.
- Anli, R.; Vural, N.; Yilmaz, S.; Vural, Y. (2004). Original Article – The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 53-62.
- Arthur, C.; Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), 2145-2148.
- Barbosa, J. (2011). Licores: de que são feitos? Disponível em <http://www.licorenigma.com/news/de%20que%20s%C3%A3o%20deitos%20os%20licores/> consultado a (15/06/2014).
- Berijani, S.; Assadi, Y.; Anbia, M. Hosseini, M.; Aghaee, E. (2006). Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection - Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 1123, 1-9.
- Blau, K.; Halket, J. (1993). *Handbook of Derivatives for Chromatography*, 2^a ed. John Wiley & Sons Ltd, England.
- Bodmer, S.; Imark, C.; Kneubuhl, M. (1999). Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammation Research*, 48(6), 296-300.
- Bogdanov, S.; Ruoff, K.; Oddo, L. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honey: A review. *Apidologie*, 35, S4-S17.
- Bover-Cid, S.; Latorre-Moratalla, M.; Veciana-Nogués, M.; Vidal-Carou, M. (2014). Processing Contaminants: Biogenic Amines. Em *Encyclopedia of Food Safety*, vol. 2, Elsevier, Cap. 13, p. 381-391.
- Busto, O.; Miracle, M.; Guasch, J.; Borrull, F. (1997). Solid Phase Extraction of Biogenic Amines from Wine Before Chromatographic Analysis of Their AQC Derivatives. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 20(5), 743-755.
- Cecchini, F.; Morassut, M. (2010). Effect of grape storage time on biogenic amines content in must. *Food Chemistry*, 123, 263-268.
- Chia, K.; Huang, S. (2006). Simultaneous derivatization and extraction of primary amines in river water with dynamic hollow fiber liquid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1103, 158-161.

Referências Bibliográficas

- Chiacchierini, E.; Restuccia, D.; Vinci, G. (2006). Evaluation of two different extraction methods for chromatographic determination of bioactive amines in tomato products. *Talanta*, 69, 548–555.
- Christoph, N.; Bauer-Christoph, C. (2007). Flavour of Spirit Drinks: Raw Materials, Fermentation, Distillation, and Ageing. Em *Flavours and Fragrances - Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, R. G. Berger (Ed.), Springer, Cap. 10, p. 219-240.
- Cosansu, S. (2009). Determination of biogenic amines in a fermented beverage, boza. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7(2), 54-58.
- Crocomo, O.; Fowden, L. (1970). Amino acid decarboxylases of higher plants the formation of ethylamine. *Phytochemistry*, 9(3), 537-540.
- Cunha, S.; Faria, M.; Fernandes, J. (2011). Gas Chromatography – Mass Spectrometry Assessment of Amines in Port Wine and Grape Juice after Fast Chloroformate Extraction/ Derivatization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8742-8753.
- DeBruin, L.; Pawliszyn, J.; Josephy, P. (1999). Detection of Monocyclic Aromatic Amines, Possible Mammary Carcinogens, in Human Milk. *Chemical Research in Toxicology*, 2(1), 78–82.
- Directiva 88/388/CEE do Conselho de 22 de Junho de 1988, relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros no domínio dos aromas destinados a serem utilizados nos géneros alimentícios e dos materiais de base para a respetiva produção; JO L 184 de 15.7.1988, p. 61.
- Directiva 91/493/CEE do Conselho de 22 de Julho de 1991, que adopta as normas sanitárias relativas à produção e à colocação no mercado dos produtos da pesca; JO L 268 de 24.09.1991, p. 15.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2011). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10), 1-93.
- Erim, F. (2013). Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 52, 239–247.
- Farajzadeh, M.; Nouri, N.; Khorram, P. (2014). Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 55:14-23.
- Fernandes, J. (2001). Desenvolvimento de metodologias de cromatografia gasosa–espectrometria de massa para a determinação de aminas biogénicas em vinhos do porto e em mostos. Aplicação ao estudo da origem e evolução em vinhos do Porto [Tese de Doutoramento]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Fernandes, J.; Ferreira, M. (2000). Combined ion-pair extraction and gas chromatography – mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *Journal of Chromatography A*, 886, 183-195.
- Fernandes, J.; Judas, I.; Oliveira, M.; Ferreira, I.; Ferreira, M. (2001). A GC-MS Method for Quantitation of Histamine and other Biogenic Amines in Beer. *Chromatographia Supplement*, 53, S-327-S-331.
- Fluka Analytical; SUPELCO Analytical. (2012). Monograph - Derivatization Reagents, For Selective Response and Detection in Complex Matrices. St. Louis, MO.

- Fogel, W. (2009). Metabolism and functions of biogenic amines. Em *Biological aspects of biogenic amines, polyamines and conjugates*, G. Dandriofosse (Ed.), Kerala: Transworld Research Network, Cap.1, p. 1–32.
- Food and Drug Administration (FDA) (2011). Scombrototoxin (Histamine) Formation. Em *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*, 4ª ed., Department of Health and Human Services, USA, Cap.7, p. 113-152.
- García-Marino, M.; Trigueros, A.; Escribano-Bailón, T. (2010). Original Article – Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 455–462.
- García-Villar, N.; Hernández-Cassou, S.; Saurina, J. (2009). Determination of biogenic amines in wines by pre-column derivatization and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 6387-6393.
- Garrafeira Nacional (2014). Categoria: Licores, disponível em <http://www.garrafeiranacional.com/licores/licores.html> consultado a (08/06/2014).
- Gerbaux, V.; Villa, A.; Monamy, C.; Bertrand, A. (1997). Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *American journal of Enology and Viticulture*, 48(1), 49-54.
- Gutiérrez, L.; Zapata, A.; Coll, L.; Déz, C. (1995). Analytical study of the mineral and sugar fractions of peach liqueurs, *Food Chemistry*, 54, 113-117.
- Halász, A.; Baráth, A.; Holzapfel, W. (1999). The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 208, 418-423.
- Heffernan, S.; Kelly, A.; Mulvihill, D. (2009). High-pressure-homogenised cream liqueurs: Emulsification and stabilization efficiency, *Journal of Food Engineering*, 95, 525-531.
- IVBAM – Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira, IP. (2014). Conhecer as Bebidas Espirituosas, disponível em <http://www.ivbam.gov-madeira.pt/Conhecer-as-Bebidas-Espirituosas-1072.aspx> consultado a (09/06/2014).
- Izquierdo-Pulido, M.; Hernández-Jover, T.; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou M. (1996). Biogenic Amines in European Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3159-3163.
- Jeannot, M.; Cantwell, F. (1996). Solvent microextraction into a single drop, *Analytical Chemistry*, 68, 2236-2240.
- Jeannot, M.; Cantwell, F. (1997). Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle. *Analytical Chemistry*, 69, 235-239.
- Kalač, P.; Křížek, M. (2003). A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer. *Journal of the Institute Brewing*, 109(2), 123-128.
- Karovičová, J.; Kohajdová, Z. (2005). Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*, 59 (1), 70-79.
- Kataoka, H. (1996). Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 733, 19-34.
- Kataoka, H.; Lord, H.; Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis, *Journal of Chromatography A*, 880, 35-62.

Referências Bibliográficas

- Kataoka, H. (2005). Gas Chromatography of Amines as Various Derivatives. Em *Quantification of Amino Acids and Amines by Chromatography: Methods and Protocols*, Journal of Chromatography Library, Elsevier, vol. 70, Cap. 2.1.2, p. 364-404.
- Lasekan, O.; Lasekan, W. (2000). Biogenic amines in traditional alcoholic beverages produced in Nigeria. *Food Chemistry*, 69, 267-271.
- Leitão, M.; Marques, A.; San Romão, M. (2005). A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control*, 16, 199–204.
- Licores Maduro (2014). Liqueur: the Production. Dutch Caribbean, disponível em <http://www.licoresmaduro.com/liqueur-production> consultado a (23/05/2014).
- Lin, Z.; Zhang, J.; Cui, H.; Zhang, L.; Chen, G. (2010). Determination of aromatic amines in environmental water sample by hollow fiberliquid phase microextraction and microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217, 4507–4510.
- Manahan, S. (1992). Organonitrogen compounds. Em *Toxicological Chemistry*, 2ed. S.E. Manahan - Lewis Publishers, Chelsea, Cap. 15, p. 347-364.
- Marcobal, A.; Polo, M.; Martín-Álvarez, P.; Moreno-Arribas, M. (2005). Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Research International*, 38, 387–394.
- Marianski, S.; Marianski, A. (2012). Liqueurs and Crèmes. Em *Home production of Vodka, Infusions and Liqueurs*, Bookmagic, LLC, Cap. 5, p. 139-148.
- Marques, A.; Leitão, M.; San Romão, M. (2008). Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. *Food Chemistry*, 107, 857-860.
- Marqués, C.; Hellín, L.; Ruiz, L.; Revill, A. (1994). Analytical study of apple liqueurs. *Z Lebensm Unters Forsch*, 198, 60-65.
- Martins, M.; Primel, E.; Caldas, S.; Prestes, O.; Adaime, M.; Zanella, R. (2012). Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. *Scientia Chromatographica*, 4(1), 35-51.
- Martuscelli, M.; Arfelli, G.; Manetta, A.; Suzzi, G. (2013). Biogenic amines content as a measure of the quality of wines of Abruzzo (Italy). *Food Chemistry*, 140, 590–597.
- Mosteiro de Singeverga – Monges Beneditinos (2014). Licor de Singeverga, disponível em <http://www.mosteirodesingeverga.com/mosteiro/page81/> consultado a (03/06/2014).
- Naila, A.; Flint, S.; Fletcher, G.; Bremer, P.; Meerdink, G. (2010). Control of Biogenic Amines in Food – Existing and Emerging Approaches, *Journal of Food Science*, 75(7), R139-R150.
- Nout, M. (1994). Fermented foods and food safety. *Food Research International*, 27(3), 291-298.
- Nout, M. (2014). Food Technologies: Fermentation. Em *Encyclopedia of Food Safety*, vol. 3, Elsevier, 168-177.
- Notou, M.; Zotou, A.; Tzanavaras, P.; Themelis, D. (2014). Automated derivatization and fluorimetric determination of biogenic amines in milk by zone fluidics coupled to liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1356, 272–276.

- Nozal, M.; Bernal, J.; Toribio, M.; Diego, J.; Ruiz, A. (2004). Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1047, 137-146.
- Ojeda, C.; Rojas F. (2009). Separation and Preconcentration by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Procedure: A Review. *Chromatographia*, 69, 1149-1159.
- Oliveira, S.; Franca, A.; Glória, M.; Borges, M. (2005). The effect of roasting on the presence of bioactive amines in coffees of different qualities. *Food Chemistry*, 90, 287-291.
- Önal, A. (2007). Analytical, Nutritional and Clinical Methods - A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103, 1475-1486.
- Önal, A.; Tekkeli, S.; Önal, C. (2013). A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 138, 509-515.
- Orata, F. (2012). Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. Em *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, Dr. Mustafa Ali Mohd, Cap. 5, p. 83-108.
- Orlando, R.; Cordeiro, D.; Mathias, A.; Rezende, K.; Gil, E. (2009). Pré-Tratamento de Amostras. *Vita et Sanitas*, 3, 122-139.
- Özdestan, O.; Üren, A. (2009). A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Talanta*, 78, 1321-1326.
- Özdestan, O. (2014). Evaluation of bioactive amine and mineral levels in Turkish coffee. *Food Research International*, 6, 167-175.
- Paramás, A.; Bárez, J.; Marcos, C.; García-Villanova, R.; Sánchez, J. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry*, 95, 148-156.
- Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. (1999). Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 71, 2650-2655.
- Pereira, V.; Pontes, M.; Câmara, J.; Marques, J. (2008). Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldehyde derivatization procedure. *Journal of Chromatography A*, 1189, 435-443.
- Prete, V.; Costantini, A.; Cecchini, F.; Morassut, M.; Garcia-Moruno, E. (2009). Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes. *Food Chemistry*, 112, 474-481.
- Proestos, C.; Loukatos, P.; Komaitis, M. (2008). Analytical, Nutritional and Clinical Methods - Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. *Food Chemistry*, 106, 1218-1224.
- Pusvaskiene, E.; Januskevicius, B.; Prichodko, A.; Vickackaite, V. (2009). Simultaneous Derivatization and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Fatty Acid GC Determination in Water. *Chromatographia*, 69, 271-276.
- Ramos, A. (2008). Manual Técnico: Ginja de Óbidos e Alcobaça. Edição do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Associação dos Produtores de Maçã de Alcobaça, disponível em http://repositorio.ipcb.pt/bitstream/10400.11/1064/1/2008_Manual%20T%C3%A9cnico%20da%20Ginja%20de%20%C3%93bidos%20e%20Alcoba%C3%A7a.pdf consultado a (02/10/2014).

Referências Bibliográficas

- Regulamento (CE) nº110/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de Janeiro de 2008 relativo à definição, designação, apresentação, rotulagem e proteção das indicações geográficas das bebidas espirituosas e que revoga o Regulamento (CE) nº 1576/89 do Conselho; JO L 39 de 13.2.2008, p. 16.
- Regulamento (CE) nº 1441/2007 da Comissão, de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios; JO L 322 de 7.12.2007, p. 12.
- Rezaee, M.; Assadi, Y.; Hosseini, M.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116, 1-9.
- Rezaee, M.; Yamini, Y.; Faraji, M. (2010). Review – Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2342–2357.
- Romano, A.; Klebanowski, H.; Guerche, S.; Beneduce, L.; Spano, G.; Murat, M.; Lucas, P. (2012). Analytical Methods – Determination of biogenic amines in wine by thin-layer chromatography/densitometry. *Food Chemistry*, 135, 1392-1396.
- Santiago-Silva, P.; Labanca, R.; Gloria, M. (2011). Functional potential of tropical fruits with respect to free bioactive amines. *Food Research International*, 44, 1264-1268.
- Santos, J.; Ribeiro, M. (1991). Aprenda a fazer licores. Editora Três, Lda. São Paulo – Brasil.
- Santos, M. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213-231.
- Sarkadi, L. (2009). Biogenic amines. Em *Process-induced food toxicants: Occurrence, formation, mitigation, and health risks*, John Wiley & Sons, Cap.3.2, p. 321-363.
- Seiler, N. (1990). Polyamine metabolism. *Digestion*, 46, 319-330.
- Silveira, T.; Tavares E.; Glória, M. (2007). Profile and levels of bioactive amines in instant coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 451-457.
- Slomkowska, A.; Ambroziak, W. (2002). Biogenic amine profile of the most popular Polish beers. *European Food Research and Technology*, 215, 380-383.
- Spano, G.; Russo, P.; Lonvaud-Funel, A.; Lucas, P.; Alexandre, H.; Grandvalet, C.; Coton, E.; Conton, M.; Barnavon, L.; Bach, B.; rattray, F.; Bunte, A.; Magni, C.; Ladero, V.; Alvarez, M.; Fernández, M.; Lopez, P.; Palencia, P.; Corbi, A.; Trip, H.; Lolkema, J. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, S95–S100.
- Supelco. Supelco-Aldrich (1998). Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions, *Bulletin* 923, disponível em <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4547.pdf> consultado a (02/07/2014).
- Tabor, C.; Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annual Review of Biochemistry*, 53, 749-790.
- Tang, T.; Shi, T.; Qian, K.; Li, P.; Li, J.; Cao, Y. (2009). Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 877, 507-512.
- Teixeira, L.; Simões, L.; Rocha, C.; Saraiva, S.; Junqueira, M. (2011). Tecnologia, composição e processamento de licores. *Enciclopédia Biosfera*, 7(12),1-17.

- Vázquez-Araújo, L.; Rodríguez-Solana, R.; Cortés-Diéguez, S.; Domínguez, J. (2013). Study of the suitability of two hop cultivars for making herb liqueurs: volatile composition, sensory analysis, and consumer study, *European Food Research and Technology*, 237, 775-786.
- Vieira, S.; Theodoro, K.; Glória, M. (2007). Profile and levels of bioactive amines in orange juice and orange soft drink. *Food Chemistry*, 100, 895-903.
- Viñas, P.; Campillo, N.; López-García, I.; Hernández-Córdoba, M. (2014). Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 2067-2099.
- Weigle, M.; DeBernardo, S.; Tengi, J. (1972). Novel reagent for the fluorometric assay of primary amines. *Journal of the American Chemical Society*, 94, 5927-5928.
- Yeğin, S.; Üren, A. (2008). Biogenic amine content of boza: A traditional cereal-based, fermented Turkish beverage. *Food Chemistry*, 111, 983-987.
- Zgoła-Grześkowiak, A.; Grześkowiak, T. (2011). Dispersive liquid-liquid microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(9), 1382-1399.
- Zhao, L.; Zhu, L.; Lee, H. (2002). Analysis of aromatic amines in water samples by liquid-liquid-liquid microextraction with hollow fibers and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 963, 239-248.
- Zotou, A.; Loukou, Z.; Soufleros, E.; Stratis, I. (2003). Determination of biogenic amines in wines and beers by high-performance liquid chromatography with precolumn dansylation and ultra-violet detection. *Chromatographia*, 57, 429-439.